

# THESES

PRESENTEES

A LA FACULTE DES SCIENCES

• ORSAY

UNIVERSITE DE PARIS

pour obtenir

le grade de DOCTEUR ES SCIENCES BIOLOGIQUES

par

Jean CHEVALLIER

Première THESE : "Etude par modifications chimiques du site actif de la trypsine".

Deuxième THESE : Propositions données par la Faculté.

Soutenues le

1968

devant la Commission d'Examen.

M. J. TONNELAT Président

Mlle J. YON

M. J. PUDLES



Orsay Série A  
N° d'ordre

Inscrit aux archives originales  
du Centre de Documentation  
C.N.R.S. sous le N° 3082.

# THESES

PRESENTEES

A LA FACULTE DES SCIENCES

D'ORSAY

UNIVERSITE DE PARIS



pour obtenir

le grade de DOCTEUR ES SCIENCES BIOLOGIQUES

par

**Jean CHEVALLIER**

Première THESE : "Etude par modifications chimiques du site actif de la trypsine".

Deuxième THESE : Propositions données par la Faculté.

Soutenues le

devant la Commission d'Examen.

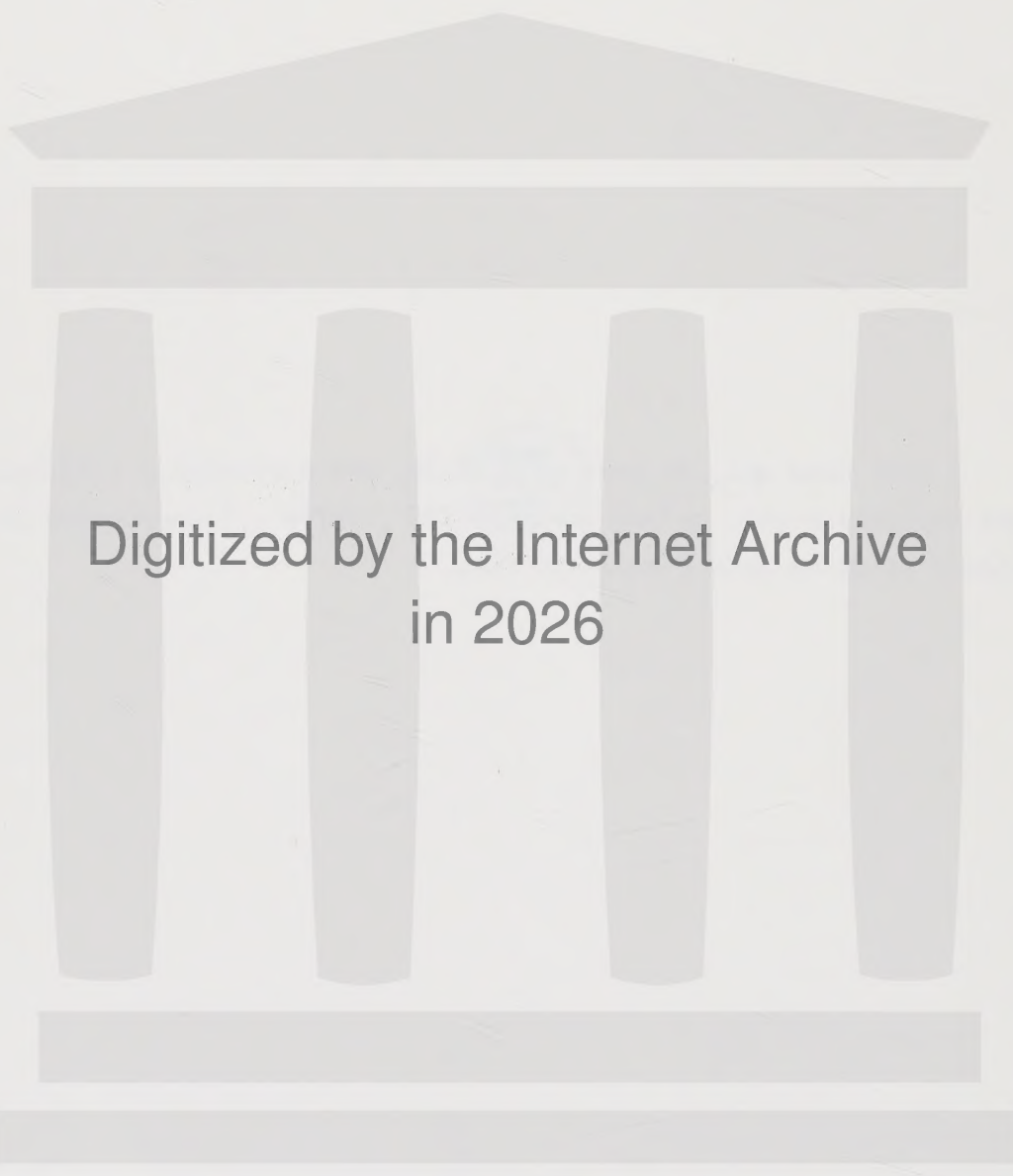
M. J. TONNELAT Président

Mlle J. YON

M. J. PUDLES



A tous ceux qui, de près ou de loin, ont participé à l'élaboration de ces quelques pages, qu'ils trouvent ici , enfin , l'expression de ma gratitude et de ma joie d'en avoir fini.



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41549931\\_0064](https://archive.org/details/IA41549931_0064)

## TABLE DES MATIERES

### INTRODUCTION

Définition du site actif d'un enzyme.

Critères d'une "bonne" modification chimique.

Données actuelles sur les acides aminés connus du site actif de la trypsine.

### PREMIERE PARTIE - DISCUSSION DES METHODES UTILISEES.

#### A - TRANSFORMATIONS CHIMIQUES.

- 1°) Acétylation
  - par l'anhydride acétique
  - par l'acétylimidazole
  - avantages et inconvénients de l'acétylation
- 2°) Méthylation.

#### B - TECHNIQUES SPECTROPHOTOMETRIQUES.

- 1°) Méthode de titrage spectrophotométrique de la N  $\epsilon$  acétyltrypsine.
- 2°) Dosage spectrophotométrique des tyrosines de la N  $\epsilon$  acétyltrypsine.
- 3°) Méthode d'évaluation des tyrosines acétylées et méthylées.
- 4°) Perturbation par le solvant.

#### C - ETUDES CINETIQUES.

- A) Présentation du schéma cinétique général que nous avons utilisé.
- B) Etablissement des équations cinétiques pour les substrats spécifiques esters et amides.
- C) Principe du dosage du site actif de l'enzyme.



## DEUXIEME PARTIE - MODIFICATIONS CHIMIQUES.

### I - DESCRIPTION DE LA N $\epsilon$ ACÉTYLTRYPSINE.

- A - Stabilité de l'enzyme acétylée sur les  $\epsilon$  NH<sub>2</sub> des lysines.
- B - Etat des chromophores tyrosines et tryptophanes de la N  $\epsilon$  acétyltrypsine.
  - 1) titrage spectrophotométrique
  - 2) perturbation par le solvant.
- C - Comportement cinétique de la trypsine acétylée.
  - 1) Comportement de la N  $\epsilon$  acétyltrypsine au pH optimum
  - 2) Etude avec des forces ioniques variables
  - 3) Comportement de la N  $\epsilon$  acétyltrypsine aux pH alcalins

Conclusion.

### II - RESULTATS DES ETUDES DE MODIFICATIONS CHIMIQUES DE LA N $\epsilon$ ACÉTYLTRYPSINE.

- A - Nature du groupe responsable de la variation des paramètres cinétiques aux pH alcalins.
  - 1)  $\alpha$  NH<sub>2</sub> de l'isoleucine N terminale ?
  - 2) résidu phénolique de tyrosine ?
    - partie théorique
    - partie cinétique
  - 3) Discussion et conclusion.
- B - Les tyrosines accessibles aux réactifs chimiques ont-elles un rôle au site actif de l'enzyme ?
  - 1) Influence de l'acétylation des tyrosines par l'acétylimidazole sur l'activité de la N  $\epsilon$  acétyltrypsine.
    - Résultats
    - Discussion
  - 2) Tentative de distinction des tyrosines accessibles à l'acétylimidazole.
    - Résultats
    - Discussion.
  - 3) Rôle possible des tyrosines accessibles au site actif de l'enzyme.

CONCLUSION.



## LISTE DES ABREVIATIONS NON USUELLES

|         |                                                                                                                    |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| BAEE    | ester éthylique du N ben <sup>2</sup> oyl L arginine                                                               |
| TAME    | ester méthylique de la N-p. toluène sulfonyl L arginine                                                            |
| BAA     | amide du N benzoyl L arginine                                                                                      |
| TAA     | amide de la N-p.toluène sulfonyl L arginine                                                                        |
| NPA     | ester acétique du paranitrophénol                                                                                  |
| DMSO    | diméthylsulfoxyde                                                                                                  |
| NATA    | amide de la N acétyltyrosine                                                                                       |
| NATRA   | amide de la N acétyltryptophane                                                                                    |
| ATEE    | ester éthylique de l'acétyltyrosine                                                                                |
| T       | trypsine                                                                                                           |
| N-AcT   | N ε acétyltrypsine - trypsine acétylée uniquement sur les ε aminés de lysine (ou TAC).                             |
| N,O-AcT | trypsine acétylée sur les ε aminés des lysines et sur quatre groupes phénoliques de tyrosine. Ne,O acétyltrypsine. |



*I N T R O D U C T I O N*

---



## I N T R O D U C T I O N

Pour déterminer le mécanisme d'action d'une protéine enzymatique, il est nécessaire de connaître la nature et l'enchaînement des acides aminés qui la composent, sa structure tridimensionnelle et sa spécificité.

Connaissant l'enchaînement des acides aminés, l'étude du mécanisme d'action d'un enzyme peut être abordée de diverses manières : - par des études chimiques en modifiant tel ou tel résidu d'acide aminé que l'on croit responsable directement ou indirectement de l'activité ; - par des études cinétiques en analysant les constantes de vitesse de transformation de divers substrats spécifiques et non spécifiques ; - par des études de conformation en essayant de suivre les modifications structurales de l'enzyme en présence de divers effecteurs, ou en déterminant sa structure aux rayons X en présence ou en absence de substrats ou d'inhibiteurs.

De la synthèse des résultats obtenus par ces trois types d'études (chimique, cinétique, structurale), on peut obtenir une description cohérente du mécanisme d'action de l'enzyme. Le puzzle que l'enzymologiste doit reconstituer pour se faire une idée du comportement de la protéine qu'il étudie ne sera complet que s'il utilise simultanément toutes ces techniques. Ceci est indispensable.

Le but de notre travail a été d'étudier la composition du site actif de la trypsine par modification chimique des éventuels acides aminés qui le constituent. Des différentes trypsines modifiées ainsi obtenues, nous avons déterminé les caractéristiques cinétiques pour saisir le rôle et l'importance des groupes transformés dans le mécanisme de la catalyse.

Avant d'aborder plus particulièrement le cas de la trypsine, il est nécessaire de définir :

- 1°) ce que l'on appelle ordinairement site actif d'un enzyme ;
- 2°) quels sont les critères d'une "bonne" modification chimique.



### 1°) Définition du site actif :

Le centre actif d'un enzyme protéolytique est une région privilégiée de la protéine par laquelle le substrat est hydrolysé. Sont au site actif de l'enzyme tous les acides aminés dont la transformation chimique perturbe l'activité catalytique. Une représentation générale d'un centre actif a été donnée par Koshland (1960) et reprise plus récemment par Singer (1967). Ces auteurs distinguent deux catégories d'acides aminés :

- les acides aminés en contact avec le substrat ;
- les acides aminés n'ayant aucun contact avec le substrat.

Ces résidus peuvent être portés par des chaînes différentes de la protéine. Le fait que les acides aminés soient en contact ou non ne préjuge en aucun cas de leur importance. Cette définition du site actif est commode, mais vague. On peut ensuite diversifier le rôle des acides aminés en les classant suivant leur action au cours des étapes de la catalyse : intervention directe dans la réaction chimique d'hydrolyse du substrat, ou dans la fixation de ce substrat sur la protéine, ou dans le maintien de l'enzyme en une structure favorable.

On a pu vérifier qu'il n'était pas possible d'isoler le site actif du reste de la protéine tout en gardant les propriétés catalytiques de l'enzyme intact dans le cas des protéases. Dans l'étude qui suit nous considérons donc que le centre actif de la trypsine est inséparable de l'ensemble protéique.

### 2°) Critères d'une "bonne" modification chimique :

Une modification chimique est intéressante si :

- a) le réactif utilisé est spécifique d'un groupe d'acide aminé donné ou si, après un autre traitement chimique, il ne reste qu'une seule catégorie de groupe modifié,
- b) le mécanisme de la réaction de l'acide aminé avec le réactif et ses caractéristiques cinétiques sont déjà parfaitement connus sur des modèles,
- c) la modification ainsi provoquée permet de transformer sensiblement le spectre de la protéine (addition de chromophores particuliers).



- d) les caractéristiques physiques du groupe ajouté (charge, par exemple) sont suffisamment connues pour savoir quel effet particulier le traitement chimique apporte dans l'environnement de l'acide aminé ainsi transformé,
- e) la réaction se fait dans des conditions compatibles avec la stabilité de l'enzyme.

Il est évidemment difficile de réunir à la fois ces cinq conditions. La question de la spécificité de la réaction sur un groupe d'acides aminés, ainsi que la recherche de conditions compatibles avec la stabilité de l'enzyme sont, à nos yeux, les deux points les plus importants. Seule l'analyse chimique des amino-acides de la protéine modifiée pourra nous dire, sans ambiguïté, si la modification est ou non spécifique. Dans le même ordre d'idée, si au cours de la réaction l'on observe une modification de l'activité, il est indispensable de savoir si l'on peut relier cette variation à la modification spécifique d'un groupe au site actif de la protéine. Il faudra donc, pour savoir si le groupe modifié est indispensable à l'activité, utiliser une méthode de "tout ou rien" (Ray et coll., 1960) qui relie une diminution (par exemple) des constantes de vitesse d'hydrolyse de substrat spécifique à la vitesse de substitution d'un acide aminé. Nous détaillerons plus loin la méthode que nous avons utilisée dans le cas de la trypsine.

Nous allons brièvement résumer quelques unes des connaissances que nous possédons sur la trypsine et sur les acides aminés de son centre actif.

1°) La trypsine est une endopeptidase, c'est-à-dire qu'elle catalyse l'hydrolyse de liaisons peptidiques dans les protéines ou les polypeptides. Cette coupure se fait spécifiquement au niveau des carboxyles de résidus lysine ou arginine.

Elle est synthétisée dans le pancréas sous forme de trypsinogène. L'activation du trypsinogène en trypsine se fait suivant un mécanisme autocatalytique et se traduit par la rupture de la sixième liaison N terminale de la chaîne avec élimination d'un hexapeptide Val Asp<sub>4</sub> Lys (Neurath, 1955 - Desnuelle et coll., 1955). Le mécanisme de cette activation et les modifications structu-



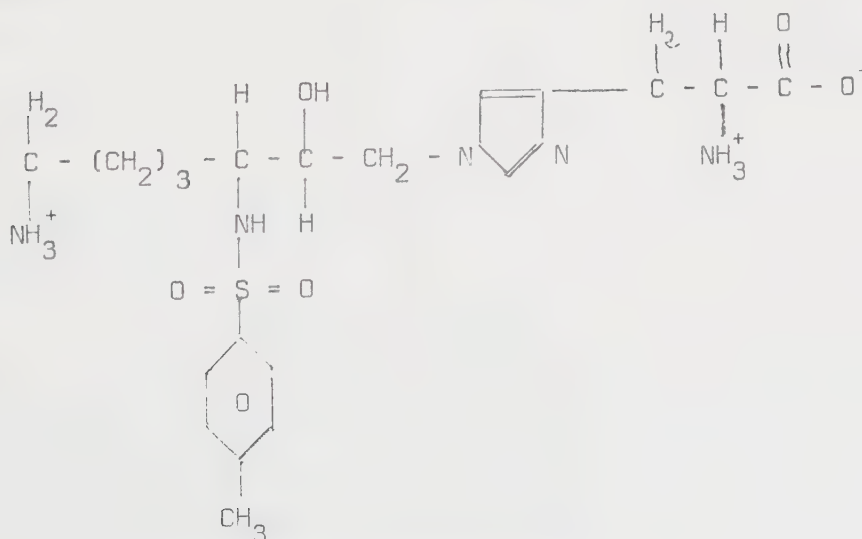
rales qu'il provoque sont décrits dans la littérature (en particulier Ladzunski et coll., 1967 - Delaage et coll., 1967).

L'enchaînement des acides aminés de la protéine a été récemment déterminé (Walsh et coll., 1964 - Mikes et coll., 1967).

## 2°) Acides aminés du site actif de la trypsine.

a) Acides aminés du centre actif de la trypsine détectés par voie chimique - sérine 183. On sait qu'il existe au centre actif de la trypsine une sérine qui réagit spécifiquement avec le diisopropylfluorophosphate et d'autres organophosphates (Balls et coll., 1952). En marquant aussi le centre actif par ce réactif radioactif, il est possible d'étudier l'enchaînement des acides aminés autour de la sérine (Dixon et coll., 1958a - Dixon et coll., 1958b - Mikes et coll., 1967).

histidine 46. Le rôle de l'histidine dans la catalyse trypsique a été mis en évidence par Shaw et coll., 1965. Ces auteurs ont utilisé un inhibiteur dont la structure était analogue à celle d'un substrat spécifique, la N tosyl L lysylchlorométhylcétone. Petra et coll. (1965) ont montré que ce corps réagissait de façon covalente avec l'azote non ionisable de l'histidine 46 pour donner :



On a pu ainsi analyser la séquence autour de l'acide aminé chimiquement modifié (Tomasek et coll., 1965 - Petra et coll., 1965).



Jusqu'à maintenant, ce sont les deux seuls acides aminés dont on sache précisément qu'ils participent au centre actif de la trypsine. Leur rôle est un rôle catalytique direct et non pas conformationnel.

b) Acides aminés du centre actif de la trypsine dont on a déterminé la nature par étude cinétique. L'étude de la constante de vitesse d'hydrolyse de substrats spécifiques par l'enzyme en fonction du pH permet de déterminer le pK de groupes intervenant dans l'activité. Gutfreund (1955) a ainsi montré qu'une histidine devait jouer un rôle dans l'activité de l'enzyme. Des études systématiques effectuées au laboratoire par Béchet (1963) sur des substrats spécifiques esters, et Monnot (1964-1969) sur des protéines, ont montré qu'un groupe de pK aux environs de 7 intervenait dans l'activité. Le pK de ce groupe varie légèrement avec la nature du substrat. Il peut être considérablement déplacé si l'enzyme hydrolyse des substrats ayant une charge positive en  $\alpha$  (Seydoux, 1966). Les études chimiques précédemment citées ont confirmé ce que l'on pensait, à savoir que ce groupe est l'histidine 46 de la chaîne enzymatique.

Par ailleurs, un autre groupe dont le pK est situé autour de 10 est décelé dans le cas d'un ester spécifique, le Nparatoluène sulfonyl-L-arginine méthyl ester (Béchet, 1963), mais pas dans le cas du benzoyl-L-arginine éthyl ester où il est de l'ordre de 12 (Béchet, 1965). Si l'on utilise une amide spécifique, la benzoyl-L-arginine amide, on retrouve ce même pK de 10 (Chevallier et coll., 1966 - Wang et coll., 1968). La nature et le rôle de ce groupement ont fait l'objet de nombreuses spéculations.

c) Acides aminés du centre actif de la trypsine dont on a déterminé la nature par d'autres méthodes.

#### 1°) Groupes carboxyliques :

D'Albis et coll. (1967) montrent que la formation de complexes enzyme-substrat coïncide avec une libération de protons à des valeurs du pH inférieures à 6. D'autres résultats obtenus par titrage des protons à pH 4,1 et par détermination des constantes d'affinité de la benzylamine pour la trypsine à pH = 3,5 et 2,5 par mesures polarimétriques, indiquent qu'il existerait une



interaction entre une charge positive de l'inhibiteur et une charge négative d'un groupe carboxyle de l'enzyme avec un pK de 4,7. Par mesure du pouvoir rotatoire, ces auteurs mettent en évidence un carboxyle de pK 3,7 dont le rôle serait différent de celui de pK 4,7.

Par ailleurs, East et coll. (1968), en étudiant le complexe trypsine-benzamidine, mettent en évidence par titrage spectrophotométrique un groupe de pK = 4,6. Ce groupe serait un carboxyle au site de fixation de la benzamidine.

## 2°) Groupe tyrosine :

D'Albis et coll. (1967), par titrage spectrophotométrique à pH alcalin en présence et en absence d'inhibiteurs compétitifs (benzylamine ou butylamine) d'une part, et par étude de l'effet du pH sur le pouvoir rotatoire spécifique de l'enzyme en présence de ces mêmes effecteurs d'autre part, pensent perturber une tyrosine de pK 10,3. Le rôle de cette tyrosine ne serait qu'un rôle conformationnel.

Pour conclure, on sait à l'heure actuelle de façon certaine que la sérine 183 et l'histidine 46 ont un rôle catalytique direct au site actif de l'enzyme. D'autre part, deux carboxyles interviennent dans l'activité de l'enzyme, l'un de pK 3,7 aurait un rôle conformationnel et l'autre de 4,7 permettrait au substrat de se fixer au site actif. Enfin, l'isoleucine N terminale et une tyrosine ont peut-être un rôle que l'on ne connaît pas de façon certaine.

Cette rapide revue des acides aminés intervenant dans l'activité de la trypsine ne fait pas mention des études effectuées à l'aide d'inhibiteurs protéiques. Nous nous sommes en effet limités à une définition restrictive du site actif : celui que l'on peut atteindre à l'aide de substrat ou inhibiteurs de faible poids moléculaire.

Comme nous l'avons vu précédemment, on ne connaît pas précisément la nature du résidu d'acide aminé dont l'ionisation se traduit dans les variations de vitesse de réaction aux pH alcalins. Le but de notre travail a été de déterminer quel est ce groupe et son rôle précis (rôle direct dans la réaction



catalytique au cours du transfert de protons qui s'y produit, ou rôle uniquement structural : maintien d'une structure tridimensionnelle favorable à l'activité de l'enzyme). Pour cela, nous avons choisi de procéder par élimination successive. Quels sont les acides aminés que nous avons étudiés ? Ce sont, d'une part, les lysines et les tyrosines dont respectivement les groupes  $\epsilon$  aminés et les groupes phénoliques ont habituellement des pK aux environs de 10, et d'autre part, par analogie avec la chymotrypsine pour laquelle il a un rôle conformationnel important, le résidu  $\alpha$   $\text{NH}_2$  de l'isoleucine N terminale. Cette liste est peut être incomplète. Les pK étant ceux obtenus par l'étude de modèles en milieu aqueux, il est évident que le "milieu protéine" est très différent du milieu aqueux, ne serait-ce que par sa constante diélectrique. Les groupes dont les pK sont les plus sensibles à ces modifications sont ceux des hydroxyles des tyrosines (Edsall et coll. 1958). Le choix de l'étude de ces trois acides aminés repose sur l'hypothèse la plus plausible ; mais il est évident que le résidu qui s'ionise avec un pK de 10 pourrait être aussi bien une chaîne latérale d'arginine dont le pK sera abaissé.

Nous avons donc modifié d'abord les groupes  $\epsilon$  aminés des lysines pour obtenir la N  $\epsilon$  acétyltrypsine (Labouesse et coll., 1967). De l'étude de ces propriétés, nous avons pu montrer que les résidus lysines n'étaient pas les groupes qui s'ionisaient avec ce pK de 10. Cette forme d'enzyme étant extrêmement stable, nous l'avons utilisée comme produit de départ pour la plupart des autres modifications chimiques.

Nous intéressant à l'isoleucine N terminale, nous avons pu montrer que l'acétylation de ce groupe  $\epsilon$  aminé entraînait une perte totale et irréversible de l'activité de l'enzyme. Ce résultat, bien qu'il ne constitue pas une preuve absolue, nous indique que ce groupe est certainement celui qui s'ionise avec un pK de 10.

Enfin, en utilisant la N  $\epsilon$  acétyltrypsine, deux voies possibles d'étude ont été choisies. D'une part, l'acétylation des tyrosines par l'acétylimidazole. D'autre part, la méthylation de ces tyrosines par le sulfate de méthyle.



Nous pensons avoir montré que le pK de 10, déterminé cinétiquement, ne dépendait en aucun cas de ces groupes tyrosines que l'on avait modifiés.

Enfin, nous avons jugé utile de nous intéresser au rôle éventuel des tyrosines au site actif de l'enzyme. La littérature sur ce sujet est assez vague et nous avons pensé que nos résultats pouvaient nous permettre de contribuer à donner une réponse avant que les études de cristallographie aux rayons X ne résolvent cette question dans le cas de la trypsine..



P R E M I E R E   P A R T I E

DISCUSSION DES METHODES UTILISEES



PREMIERE PARTIE - DISCUSSION DES METHODES UTILISEES

A - TRANSFORMATIONS CHIMIQUES.

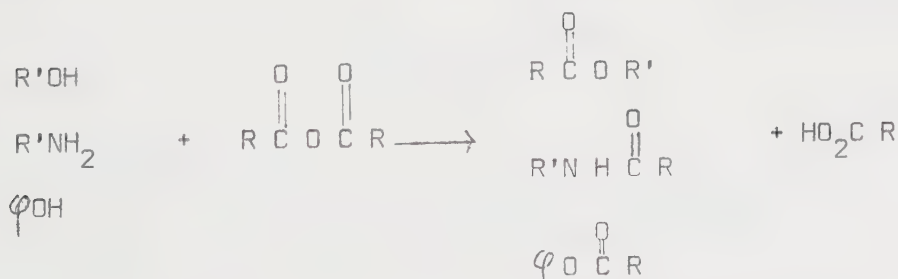
1°) Acétylation.

Pour acétyler l'enzyme, nous avons utilisé, suivant les groupes que nous voulions transformer, soit l'anhydride acétique, soit l'acétylimidazole.

Les exemples nombreux de la littérature repris en partie par Riordan et coll. (1965) et Derek (1967), montrent que l'anhydride acétique réagit mieux que l'acétylimidazole sur les groupes aminés. Par ailleurs, le second réactif est presque strictement spécifique des groupements phénoliques des tyrosines. Il est difficile de donner des chiffres globaux sur les réactivités des différents agents vis-à-vis des groupes à modifier, les pourcentages d'acétylation variant sensiblement suivant les protéines. Nous discuterons successivement l'utilisation de l'anhydride acétique, puis celle de l'acétylimidazole.

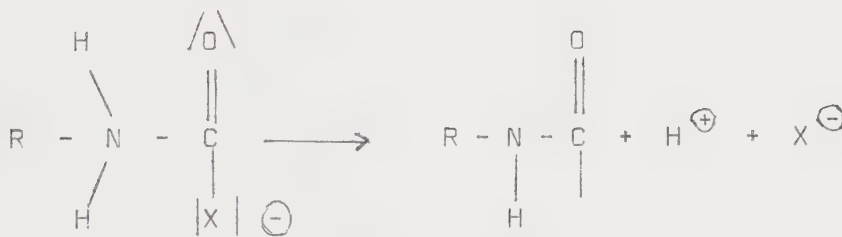
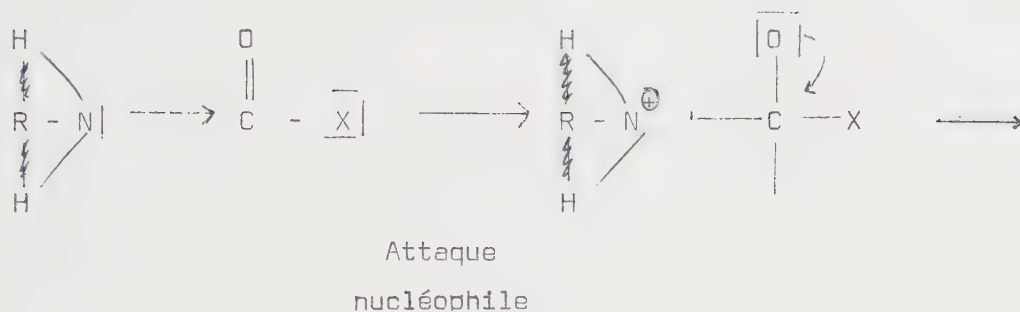
a) par l'anhydride acétique :

L'anhydride acétique réagit en acylant les alcools aliphatiques, les groupements phénoliques et les amines primaires suivant les réactions globales :



Le mécanisme de ces réactions est une substitution nucléophile. Si l'on considère, par exemple, le cas des ε NH<sub>2</sub> des lysines, on peut écrire les réactions de la manière suivante :





Peuvent donc théoriquement réagir au cours de l'acétylation par l'anhydride acétique tous les résidus hydroxyles des sérines, la fonction phénol des résidus tyrosines, les groupements  $\epsilon$  NH<sub>2</sub> des lysines ainsi que l' $\alpha$  NH<sub>2</sub> de l'isoleucine N terminale. L'anhydride acétique est un réactif d'acétylation des groupes aminés et nous ne reviendrons pas sur l'abondante littérature à ce sujet. Notons seulement qu'il réagit préférentiellement sur les formes -NH<sub>2</sub> des résidus aminés. Nous l'avons utilisé pour préparer la N  $\epsilon$  acétyltrypsine (trypsine modifiée sur les  $\epsilon$  aminés des lysines uniquement) et pour obtenir la N  $\epsilon$  acétyltrypsine acétylée sur l' $\alpha$  NH<sub>2</sub> de l'isoleucine.

#### b) par l'acétylimidazole :

L'anhydride acétique et l'acétylimidazole peuvent l'un et l'autre acétyler les groupes phénoliques des tyrosines. On préfère le second pour les raisons suivantes :

1) Béthune et coll. (1964), en travaillant sur la carboxypeptidase A de boeuf, ont montré, par dispersion rotatoire et électrophorèse, que les propriétés physicochimiques de la protéine étaient plus perturbées après traitement par



l'anhydride acétique que par l'acétylimidazole, les modifications de l'activité estérasique restent les mêmes. L'anhydride acétique est un réactif moins "doux" que l'acétylimidazole.

2) L'acétylation par l'anhydride acétique des résidus ε aminés des lysines nécessite de fortes concentrations de réactif (jusqu'à 1 % en volume d'anhydride acétique 10 M dans le milieu). Il est connu que l'ion acétate catalyse l'hydrolyse de la liaison phénylacétate même à des pH neutres (Bender et coll., 1957-1958). Il est donc nécessaire d'éviter, dans la solution, des concentrations importantes d'agent nucléophile qui catalysent l'hydrolyse de cette liaison (ion acétate, tampon tris hydroxyaminométhane, hydroxylamine, etc..., Dayan et coll., 1964) si l'on veut conserver les groupes phénoliques acétylés. Comme la concentration d'ion acétate est importante au cours de la réaction de la trypsine avec l'anhydride acétique, nous risquons de désacétyler les groupes tyrosines au fur et à mesure qu'ils sont substitués. Utilisant des quantités d'acétylimidazole beaucoup plus faibles que les concentrations d'anhydride acétique, la réaction se déroule en présence de beaucoup moins d'agent nucléophile, et nous pouvons espérer qu'ainsi les tyrosines ne se désacétyleront pas spontanément.

3) Il est possible d'utiliser l'acétylimidazole à des pH où la protéine est stable. A pH 7 où ce réactif est le moins hydrolysé (Jencks et coll., 1959) la N ε acétyltrypsine peut rester plusieurs heures à la température de la pièce sans perdre de son activité (voir plus loin). D'autre part la constante de vitesse de la catalyse de l'hydrolyse de la liaison phénylacétate par l'imidazole libre dans le milieu est faible (Jencks, 1958). Un pH de 7 sera donc favorable à l'acétylation des tyrosines par ce réactif. Nous avons utilisé l'acétylimidazole pour former la N ε O acétyltrypsine et pour modifier la N ε acétyltrypsine méthylée sur un certain nombre de tyrosines (voir plus loin).

#### c) Avantages et inconvénients de l'acétylation.

- Spécificité.

Nous avons vu que si l'acétylimidazole est assez strictement spécifique des groupes phénoliques, il n'en est pas de même de l'anhydride acétique qui



permet aussi de modifier partiellement les tyrosines. Cet ennui est minime puisqu'il est possible d'hydrolyser les liaisons phénylacétates par un agent nucléophile alors que la liaison N-Ac est stable dans ces conditions. Il faudra seulement commencer par préparer la N  $\epsilon$  acétyltrypsine, la traiter par l'hydroxylamine pour n'avoir que les  $\epsilon$  aminés des lysines modifiés, puis traiter la protéine par l'acétylimidazole pour suivre la substitution des groupes phénoliques. Nous ne pouvons, par cette méthode, étudier une trypsine uniquement modifiée sur les tyrosines.

Ces réactifs modifient-ils les groupes alcools aliphatiques des sérines ? Il est très difficile d'acétyler les groupes hydroxyles des sérines dans les conditions où l'on travaille. Riordan et coll. (1965) n'ont pu acyler les résidus hydroxyles des sérines dans le cas de la poly L séryl L glutamate. Ils notent cependant que, pour la ribonucléase, la réactivité de ces groupes est meilleure pour l'anhydride acétique, mais que, aux concentrations où ils travaillent (60 fois plus de réactif que de groupes à transformer), aucun résidu sérine de la trypsine n'est modifié. Nous discuterons le cas de la sérine du site actif de la trypsine lorsque nous étudierons plus en détail la réaction de l'enzyme avec l'acétylimidazole.

#### - Stabilité des réactifs et des produits de la réaction.

Nous avons vu que l'acétylimidazole était relativement stable à pH neutre. Sa stabilité décroît très rapidement aux pH acides (Bruice et coll., 1967). L'anhydride acétique n'est pas très soluble dans l'eau mais il est pratiquement immédiatement hydrolysé en solution au-dessus de pH 7,5-8. Il est possible de l'utiliser cependant à des pH de l'ordre de 10 en l'ajoutant en plus grandes quantités, mais nous sommes alors limités par la stabilité de l'enzyme à ces pH. D'autre part nous savons que les résidus O-acétylés des tyrosines sont instables aux pH supérieurs à 9-9,5 et que leur vitesse de désacétylation dépend du pK du groupe phénolique acétylé (Karibian et coll., 1968). Les groupes aminés acétylés sont stables. Il va donc être difficile, d'une part, d'acétyler à différents pH au-dessus de pH 8 et, d'autre part, d'utiliser la N  $\epsilon$  O acétyltrypsine (forme de



trypsine acétylée sur les  $\epsilon$  aminés des lysines et sur les tyrosines accessibles) pour des études d'activité aux pH alcalins. Ceci limite assez sensiblement l'intérêt de cette acétylation.

- Caractéristiques physiques du substituant acétyle :

Le remplacement d'un hydrogène par le groupe  $\begin{array}{c} \text{C} - \text{CH}_3 \\ || \\ \text{O} \end{array}$  peut modifier

de façon sensible la polarité du milieu, tout en supprimant la possibilité de liaison hydrogène qui pouvait exister avant la substitution.

D'autre part, la substitution du groupe aminé supprime les charges portées par les lysines. Ce fait a une grande importance pour le comportement de la TAC en fonction du pH. Enfin, l'inconvénient majeur de ce substituant est qu'il ne présente aucun caractère chromophore, ce qui limite considérablement son utilisation. Il est heureusement possible de noter des différences caractéristiques dans les spectres des tyrosines libres et des tyrosines acétylées (Simpson et coll., 1963 - Karibian et coll., 1968). Les effets hypo et hypsochromes sont uniquement dus à l'acétylation de l'hydroxyle phénolique comme on peut le voir sur des modèles. Simpson et coll. (1963) les remarquent aussi dans le cas d'autres enzymes.

L'acétylation est donc, pour nous, un excellent moyen de bloquer le groupe  $\epsilon$  aminé libre de la lysine. C'est une substitution spécifique si l'on prend soin de désacétyler les tyrosines par l'hydroxylamine. En utilisant la N  $\epsilon$  acétyltrypsine comme enzyme de départ, il est donc possible de modifier spécifiquement les tyrosines libres et de vérifier, à des pH neutres seulement, l'effet de cette réaction sur le comportement de l'enzyme.

## 2°) Méthylation

Le diméthylsulfate est utilisé comme agent méthylant le résidu phénolique des tyrosines de la N  $\epsilon$  acétyltrypsine. On sait qu'en milieu alcoolique à pH légèrement alcalin, ce réactif modifie les phénols suivant la réaction :





Pour solubiliser le sulfate de méthyle il est nécessaire de l'ajouter dans de l'éthanol à la solution réactionnelle. A pH 9,5-9,6, à 4°, dans un milieu contenant 10 % d'alcool la constante de vitesse d'hydrolyse spontanée du sulfate de méthyle est de l'ordre de  $10^{-6}$ - $10^{-7}$  sec<sup>-1</sup>. Sur un modèle, la N acétyltrypsine amide, à concentration saturante en sulfate de méthyle, en tenant compte de la concentration de tyrosine ionisée réactive dans le milieu, la vitesse apparente de méthylation est  $10^4$  à  $10^5$  fois plus rapide que la vitesse d'hydrolyse du réactif. Si l'on augmente le pH, la concentration de forme réagissante TyrO<sup>-</sup> croît. La vitesse d'hydrolyse spontanée du réactif augmentera mais le rapport réactif/TyrO<sup>-</sup> sera toujours de l'ordre de 1 000 à 500. Le sulfate de méthyle sera donc en excès au cours de la réaction.

- Spécificité de la réaction :

Le diméthyle sulfate est un réactif peu spécifique. Dans des conditions différentes, peuvent réagir : les phénols, les -SH, les hydroxyles aliphatiques, les groupes aminés, les groupes guanidyles et les carboxyles (Olcott et coll., 1947). L'estérification des carboxyles se fait, en général, assez lentement et à des pH acides ; nous pensons donc que cette réaction n'a pas lieu. Il n'y a pas de groupes -SH dans la trypsine. Parmi les groupes comprenant l'azote, les groupes aminés sont bloqués par acétylation et les autres ne semblent réagir que très lentement à pH neutre (en particulier les azotes des imidazoles). La réaction étant poursuivie pendant 6 heures au maximum à pH 10, nous pensons que ces groupes ne réagissent pas. A notre avis, seuls les hydroxyles aliphatiques et les phénols pourront réagir à pH alcalin. Nous verrons plus loin qu'il n'est pas exclu que la sérine du site actif soit modifiée au cours de la méthylation des tyrosines ainsi que peut-être un des azotes de l'histidine active. Les conditions choisies (pH 10, 10 % d'EtOH, 2-4°) sont les plus favorables pour la substitution des groupes phénoliques, compte tenu du pK d'ionisation des tyrosines et de la stabilité de l'enzyme.

- Avantages et inconvénients de cette substitution :

Le principal intérêt de cette substitution réside d'une part dans la stabilité des produits de la réaction (en effet, les phénols méthylés sont particulière-



ment stables aux pH alcalins, ce qui nous a permis de travailler sur des formes d'enzyme substituées sur les tyrosines dans des conditions où les groupes O-acétylés s'hydrolysent spontanément) et, d'autre part, dans le fait que l'on supprime aussi l'ionisation des groupes tyrosines que l'on a substitués.

Ce réactif est, d'autre part, sensible au pH puisqu'il ne réagit que sur les formes ionisées des phénols. Il sera donc possible, en opérant à différents pH, de distinguer les tyrosines qui, s'ionisant les premières, réagiront plus vite que celles de pK plus élevées. C'est un avantage supplémentaire sur les acétylations pour lesquelles cette distinction n'est pas possible. Aucune autre application n'est envisageable puisque ce substituant n'est pas un groupe "rapporteur". Le groupe méthyle est peu encombrant et sa présence ne perturbera pas le spectre d'absorption de l'enzyme entre 450 mμ et 240 mμ.

Nous avons ainsi préparé, à partir de la N ε acétyltrypsine, deux formes méthylées de l'enzyme.

L'acétylation et la méthylation constituent deux méthodes qui se complètent assez bien ici. Il n'en reste pas moins vrai que ces modifications, pour faciles qu'elles soient à réaliser, restent d'un intérêt limité pour l'étude des changements de conformation de l'enzyme au cours de la catalyse : le substituant acétyl le modifiant très peu le spectre de la protéine et le méthyle ne le perturbant pas du tout.

## B - TECHNIQUES SPECTROPHOTOMETRIQUES.

Sous ce vocable nous avons regroupé toutes les expériences, triviales ou non, que nous avons été amenés à faire au cours de cette étude. Nous avons pensé qu'il était bon de discuter un peu ces techniques dont les résultats contredisent quelquefois ceux obtenus par d'autres méthodes moins sophistiquées.

### 1°) Méthode de titrage spectrophotométrique de la trypsine acétylée.

La concentration des solutions mères d'acétyltrypsine est déterminée par mesure de l'absorbance à 280 mμ avec  $E_{1\text{ cm}}^{1\text{ mg/ml}} = 1,63$ . Cette valeur a été récemment déterminée au laboratoire. Pour évaluer la concentration des solutions



d'enzyme nous déterminons la densité optique à 280 m $\mu$  et la corrigeons, le cas échéant, de la différence due à une diffusion de la lumière provoquée par une aggrégation possible des molécules en faisant son spectre d'absorption de 450 m $\mu$  à 300 m $\mu$  suivant la méthode de Leach et coll. (1960).

## 2°) Dosage spectrophotométrique des tyrosines de la N $\epsilon$ acétyltrypsine.

Le spectre d'absorption des tyrosines, dont l'un des pics est à 275 m $\mu$ , présente, lorsque l'on opère à pH alcalin, un effet bathochrome (pic déplacé à 295 m $\mu$  s'expliquant par l'augmentation de l'effet de résonance du noyau benzénique et du caractère donneur d'électron lorsque le substituant -OH s'ionise), et un effet hyperchrome ( $\epsilon$  molaire augmenté, dû à la modification de la symétrie de la molécule). On utilise classiquement cet effet bathochrome pour titrer les résidus tyrosines d'une protéine.

Nous enregistrons simultanément à l'aide d'un spectrophotomètre les spectres d'absorption de deux solutions de N  $\epsilon$  acétyltrypsine de même concentration mais différant par leur pH. Nous pouvons obtenir directement la différence de densité optique avec précision. Pour que les résultats obtenus par cette méthode de titrage soient indiscutables, il est nécessaire :

1) de connaître très précisément la valeur du  $\Delta\epsilon$  molaire de la tyrosine dans toutes les conditions (température, force ionique, concentration en urée) dans lesquelles on travaille. La différence d'absorption en fonction du pH peut être évaluée sur des modèles : tyrosine libre (Wetlaufer, 1962) ou N acétyltyrosine amide (Edsall et coll., 1958) mais il est préférable de prendre l'enzyme comme référence, la valeur obtenue étant plus juste. Les valeurs de  $\Delta\epsilon$  ont été déterminées pour chaque concentration d'urée utilisée (6 M et 4 M) parce que cet agent dénaturant perturbe légèrement le spectre d'absorption de la protéine (Wetlaufer, 1962 - A. d'Albis, communication personnelle).

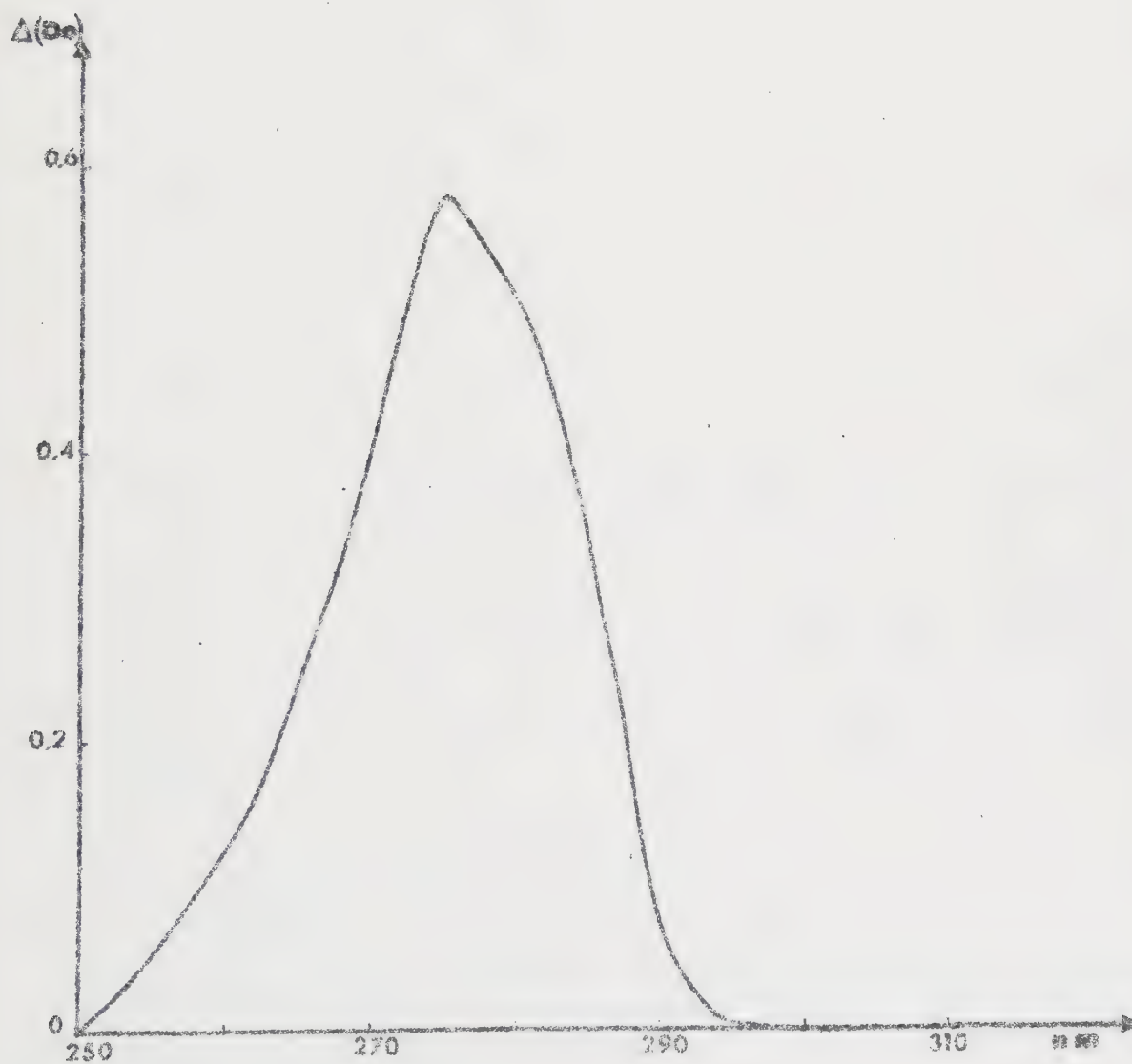
2) de choisir avec soin la longueur d'onde à laquelle on veut évaluer la différence d'absorption des tyrosines. Dans notre cas nous aurions eu apparemment intérêt à nous placer vers 244 m $\mu$  où la différence d'absorption  $\varphi O^-/\varphi OH$  est trois fois plus importante qu'à 300 m $\mu$ . Mais à cette longueur d'onde peuvent



Figure 1 : Spectre de différence de la N-Ac Tyr-NH<sub>2</sub> / N-Ac Tyr-NH<sub>2</sub>  
CC(=O)Nc1ccc(O)cc1 / CC(=O)Nc1ccc(OC(=O)C)cc1

solutions  $4 \times 10^{-4}$  M dans HCl  $10^{-3}$  M

( d'après Karibian et coll 1968)





apparaître des différences d'absorption dues à d'autres acides aminés (Wetlaufer, 1962). Nous nous sommes donc placés à 300 m $\mu$  pour limiter le plus possible les variations spectrales dues à la présence des tryptophanes.

### 3°) Méthodes d'évaluation des tyrosines acétylées et méthylées.

a) Evaluation du nombre de tyrosines acétylées. Nous ne reviendrons pas sur le principe de cette méthode spectrophotométrique de mesure largement pratiquée sur différentes protéines (Simpson et coll., 1963 - Karibian et coll., 1968 - Chevallier et coll., 1968). L'étude de l'acétylation des tyrosines est facilitée par les variations spectrales provoquées par cette substitution. On observe des effets hypsochromes (maximum du spectre déplacé vers les plus courtes longueurs d'onde) et hypochromes (diminution de l'absorption molaire) tout-à-fait caractéristiques de cette modification des tyrosines (Figure 1).

Nous évaluons à 275 m $\mu$  la variation de densité optique au cours de la désacétylation en présence d'hydroxylamine 0,5 M en admettant un  $\Delta\epsilon$  molaire TyrOH/TyrOAc de 1540, valeur déterminée sur un modèle et non sur l'enzyme.

b) évaluation du nombre de tyrosines méthylées. Le nombre de tyrosines méthylées est déterminé spectrophotométriquement à 300 m $\mu$ , par différence entre le nombre de tyrosines ionisables au temps zéro de la réaction et le nombre de celles ionisables au temps t. Cette détermination repose sur le fait que le spectre d'une tyrosine libre sous forme OH est pratiquement identique à celui d'une tyrosine méthylée (Wetlaufer, 1958). Nous travaillerons toujours dans des conditions dénaturantes (urée 6 M, NaOH 0,1 N) qui permettent de dévoiler tous les résidus tyrosines.

La validité de cette méthode repose :

- 1) sur l'hypothèse qu'à pH 13 en urée 6 M tous les résidus tyrosines de l'enzyme sont modifiés.
- 2) sur l'exactitude de la détermination du  $\Delta\epsilon$  molaire TyrO<sup>-</sup>/TyrOH dans ces conditions. L'erreur tolérée doit être toujours inférieure à 10 % puisqu'il y a 10 tyrosines dans la trypsine.



#### 4°) Perturbations par le solvant.

Herskovits et Laskowski ont eu l'idée en 1960 d'utiliser la propriété qu'ont les spectres UV des composés aromatiques d'être perturbés par des solvants pour étudier l'état des tyrosines et des tryptophanes dans les protéines globulaires. Plus récemment Laskowski a fait le point de cette méthode (1966). Nous n'insisterons pas sur la technique elle-même décrite dans la littérature ; nous préciserons seulement les hypothèses et les restrictions qu'il faut faire pour que cette méthode soit productive. Les hypothèses sont au nombre de deux ; elles ont trait à l'influence du perturbant sur la structure de la protéine étudiée.

- 1) Il faut que l'effet du solvant soit suffisamment faible pour perturber uniquement le spectre des chromophores accessibles n'affectant pas ceux qui sont partiellement ou complètement enfouis dans la protéine. Il a été montré que le spectre des chromophores enfouis n'intervenait pas dans les spectres de différence obtenus. Autrement dit, le solvant ne doit pas entraîner de dénaturation de la protéine, ni même de changements de conformation faibles mais qui démasqueraient ou masqueraient des groupes chromophores.
- 2) Il faut éviter que le perturbant ne modifie trop la couche de solvation de la protéine : l'effet alors observé ne serait pas spécifique de la perturbation des groupes chromophores.

Il est possible, en utilisant des perturbants de différents volumes efficaces, de déterminer le nombre de chromophores facilement et partiellement accessibles et par différence le nombre de ceux que l'on ne perturbe pas.

Les restrictions qu'il faut faire sont de deux sortes :

- 1) On ne peut pas identifier les groupes chromophores perturbés dans la chaîne protéique. C'est la principale objection à cette méthode.
- 2) S'ajoutant aux remarques faites précédemment sur la nature et les effets du perturbant signalons les points suivants :

- le maximum des spectres de perturbation est situé pour les trypto-



phanes à 291-294 m $\mu$ , et pour les tyrosines à 288-286 m $\mu$ . L'intensité des spectres est trois fois plus importante pour les premiers que pour les seconds ; l'étendue de la zone de réponse à la perturbation est plus grande pour les tryptophanes que pour les tyrosines. Si la protéine étudiée possède un seul tryptophane et une seule tyrosine libres, le spectre de perturbation du second ne sera pas visible bien que l'acide aminé soit perturbé (Herskovits et coll., 1968 a et b).

- la question du choix de la référence est très importante : c'est elle qui donne lieu, la plupart du temps, aux discussions sur la validité des résultats. Nous avons pris comme modèle la N acétyltryptophane amide et la N acétyltyrosine amide pour l'étude de la trypsine acétylée. Nous pensons avoir obtenu des résultats suffisamment précis.

Exception faite de la perturbation de solvant, les méthodes spectrophotométriques discutées ici sont des opérations de routine extrêmement fidèles et pratiques dont les avantages pallient largement les inconvénients.

## C - ETUDES CINÉTIQUES.

Nous allons, dans ce chapitre, présenter d'une part la théorie sur laquelle reposent les études cinétiques que nous avons entreprises, d'autre part les différentes relations qui nous permettront d'exploiter les résultats que nous obtenons.

### A) Présentation du schéma cinétique général que nous avons utilisé.

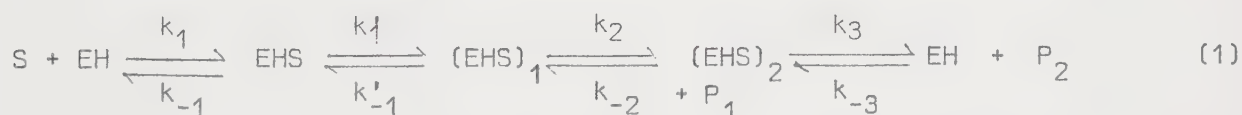
La trypsine catalyse spécifiquement l'hydrolyse des liaisons peptidiques au niveau des carboxyles de la lysine et de l'arginine. La réaction procède par plusieurs intermédiaires. L'existence d'un complexe d'adsorption du substrat sur l'enzyme, ou complexe de Michaelis, est admise depuis longtemps. La formation de ce complexe est limitée par la vitesse de diffusion des réactifs dans le milieu. A l'heure actuelle, à la suite de nombreuses études sur la chymotrypsine (en particulier Marini et coll., 1960 - Bender et coll., 1962a et b - Bernhard et coll., 1965 - Charney et coll., 1967 - Bernhard, 1968), et sur la trypsine



(Steward et coll., 1959 - Bender et coll., 1964 - Barman et coll., 1966), l'existence de l'acylenzyme, espèce chimique définie dans laquelle la sérine du site actif est acylée, n'est plus mise en doute.

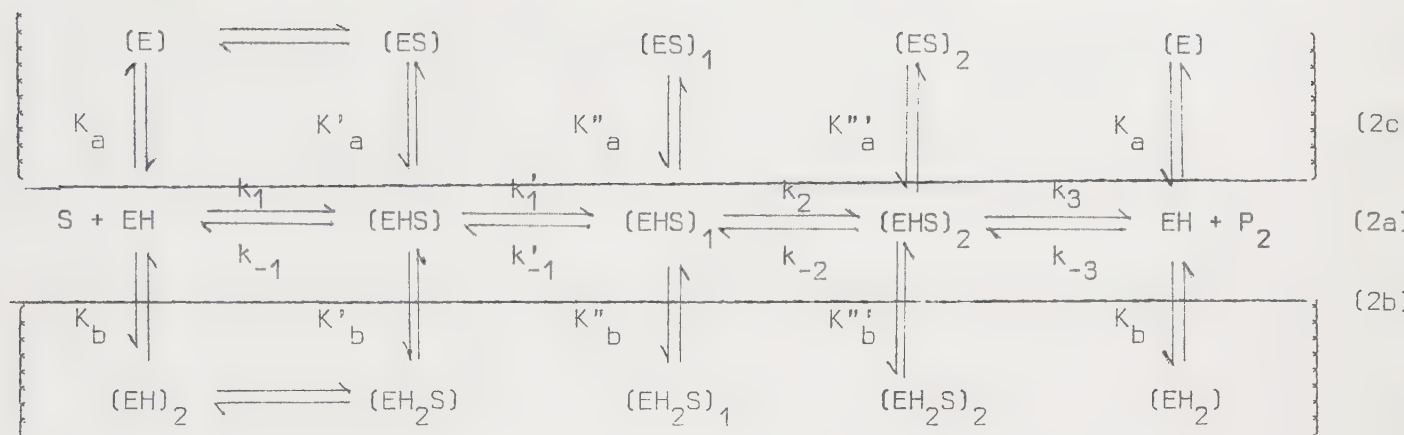
L'utilisation de techniques rapides a montré qu'il était possible de déceler l'existence d'autres complexes intermédiaires beaucoup moins stables que l'acylenzyme. S'il est à peu près certain que d'autres formes existent, il est encore trop tôt pour dire quelle est exactement leur nature (complexe tétrahédrique, complexe de transconformation, ...). Dans le cas particulier de la trypsine, Johannin et coll., (1966) pensent mettre en évidence un complexe de transconformation comme Moon et coll. l'ont fait pour la chymotrypsine (1965). De leur côté, Barman et coll. (1966) voient deux complexes différents entre le complexe de Michaelis et l'acylenzyme.

En tenant compte de l'existence du complexe de Michaelis, d'un complexe de transconformation et d'un acylenzyme on peut écrire le schéma cinétique suivant :



avec E l'enzyme libre, S le substrat, ES,  $ES_1$ ,  $ES_2$  respectivement le complexe de Michaelis, le complexe de transconformation et l'acylenzyme.  $P_1$  et  $P_2$  sont les produits de la réaction qui dépendent du substrat utilisé (voir plus loin).  $k_2$  est la constante d'acylation et  $k_3$  la constante de désacylation. Nous verrons plus loin comment on peut les évaluer. Les constantes inverses ( $k_{-1}$ ,  $k'_{-1}$ , etc...) sont plus petites que les constantes directes puisque la réaction d'hydrolyse du substrat a lieu. On sait que, suivant le pH, deux groupes interviennent successivement pour contrôler l'activité de l'enzyme, ce qui veut dire qu'il peut se trouver sous les formes  $EH_2$ , EH, E. Leur existence dans le milieu à un pH donné dépend des constantes d'ionisation des groupes responsables de l'activité. Le schéma (1) peut alors s'écrire sous une forme beaucoup plus générale que nous utiliserons dorénavant :





S représente le substrat dont l'état d'ionisation ne varie pas dans toute la zone de pH où la réaction est étudiée ; E, EH,  $\text{EH}_2$  sont les différents états d'ionisation de l'enzyme entre pH 6 et 11 ; EH, EHS,  $\text{EH}_2\text{S}$  ceux du complexe de Michaelis ;  $\text{[ES]}_1$ ,  $\text{[EHS]}_1$ ,  $\text{[EH}_2\text{S]}_1$  ceux du complexe de transconformation ;  $\text{[ES]}_2$ ,  $\text{[EHS]}_2$ ,  $\text{[EH}_2\text{S]}_2$  ceux de l'acylenzyme.  $K_a$ ,  $K'_a$ ,  $K''_a$ ,  $K'''_a$  sont les constantes d'ionisation du groupe responsable de l'activité aux pH alcalins ; de même  $K_b$ ,  $K'_b$ ,  $K''_b$ ,  $K'''_b$  sont les constantes d'ionisation du groupe responsable de l'activité aux pH acides.

Par un traitement cinétique classique, analogue à celui de Krupka et coll. (1960), Alberty et coll. (1963), en admettant que les seules formes ioniques réactives sont (EH), (EHS),  $\text{[EHS]}_1$  et  $\text{[EHS]}_2$ , on aboutit à une équation des vitesses de la forme :

$$v = \frac{V (s)}{K_{m \text{ app}} + [S]} e$$

dans laquelle V (vitesse maximum) et  $K_{m \text{ app}}$  (constante de Michaelis apparente) sont des paramètres cinétiques ayant des valeurs complexes suivant les substrats étudiés.



B) Etablissement des équations cinétiques pour les substrats spécifiques esters et amides.

- Conditions générales d'établissement de ces relations.

Pour déterminer les paramètres cinétiques d'hydrolyse de ces substrats nous nous plaçons toujours à l'état stationnaire :

$$\frac{d(\text{complexes intermédiaires})}{dt} = 0 \quad \text{et} \quad E_{\text{total}} \ll S$$

De plus, suivant le pH que l'on considère, on ne tiendra compte que de la partie du schéma correspondant à la zone d'ionisation de l'enzyme (2a au pH optimum, 2b aux pH inférieurs à 7, et 2c aux pH alcalins).

1 - Esters

- Relations utilisées pour déterminer les paramètres cinétiques d'hydrolyse des esters au pH optimum.

Si le substrat est un ester spécifique de formule générale

$$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \quad \text{O} \\ | \quad | \quad | \\ \text{R}-\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{OR}'' \\ | \\ \text{R}' \end{array}$$

le produit  $P_1$  est un alcool  $\text{R}''\text{OH}$  et  $P_2$  un acide

$$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ | \quad | \\ \text{RN}-\text{C}-\text{COOH} \\ | \\ \text{R}' \end{array}$$

relations donnant les paramètres cinétiques d'hydrolyse des esters uniquement au pH optimum où nous avons le plus souvent travaillé (schéma cinétique 2a). Pour ces substrats Béchet (1964) a montré que l'étape de désacylation est limitante.  $k_3$  est inférieure à toutes les autres constantes de vitesse. En posant que, dans tous les cas nous avons  $[E_t] \ll [S]$ ,  $K_{m \text{ app}} < [S]$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_{-2}$  et  $k_{-3}$  négligeables respectivement devant  $k_1$ ,  $k_2$  et  $k_3$ , sans faire d'autres hypothèses particulières sur les valeurs relatives des constantes les unes par rapport aux autres, on peut écrire :

$$v = k_{\text{cat}} = \frac{k_1' k_2 k_3}{k_1' k_2 + k_{-1}' k_2 + k_1' k_3 + k_{-1}' k_3 + k_2 k_3} \quad (e) \quad (3)$$



$k_{cat}$  représente la constante de désacylation apparente que l'on obtient expérimentalement, et

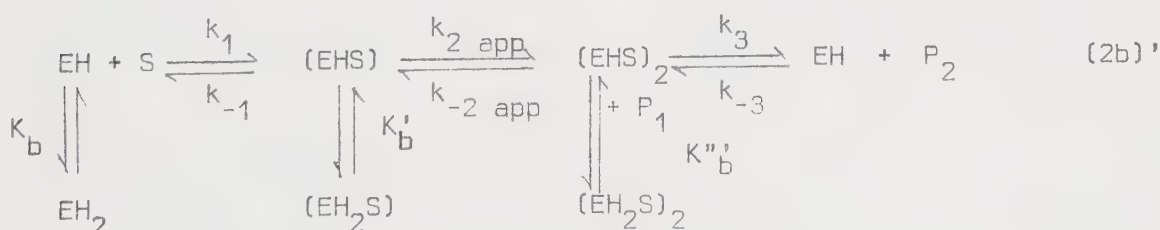
$$K_{m \text{ app}} = \frac{k_{-1} k'_{-1} k_{-2} + k_{-1} k'_{-1} k_3 + k_{-1} k_2 k_3 + k'_1 k_2 k_3}{k_1 (k'_1 k_2 + k'_1 k_{-2} + k'_{-1} k_{-2} + k'_1 k_3 + k'_{-1} k_3 + k_2 k_3)} \quad (4)$$

Ces expressions compliquées peuvent s'écrire, en tenant compte des hypothèses que l'on a fait précédemment, sous la forme plus simple suivante :

$$k_{cat} = \frac{k'_1 k_3}{k'_1 + k_3} \quad \text{et} \quad K_{m \text{ app}} = K_S \frac{k_3}{k'_1 + k_3}$$

- Relations utilisées pour déterminer les paramètres cinétiques d'hydrolyse des esters à pH acide.

L'expression de ces paramètres cinétiques est assez simple au pH optimum mais se complique aux pH alcalins avec les variations probables de  $k'_1$  et  $k_2$ . Au cours de l'étude de la force ionique sur les paramètres cinétiques de l'hydrolyse des esters spécifiques de la trypsine entre pH 6 et 8, nous avons utilisé un schéma cinétique plus simple dans lequel on n'a pas tenu compte du complexe de transconformation  $(EHS)_1$  :  $k_2$  est alors une constante complexe englobant  $k'_1$ . Nous obtenons alors (en gardant les mêmes notations que pour le schéma 2b) :



Dans ce cas on aura :

$$k_{cat(\text{pH})} = \frac{k_{2 \text{ app}} k_3}{k_{2 \text{ app}} \left( 1 + \frac{H^+}{K''_b} \right) + k_3 \left( 1 + \frac{H^+}{K'_b} \right)} \quad (5)$$



$$\text{et } K_{m \text{ app}} (\text{pH}) = \frac{\left[ k_{-1} \left( 1 + \frac{H^+}{K_b} \right) + k_{2 \text{ app}} \right] k_3}{k_1 \left[ k_{2 \text{ app}} \left( 1 + \frac{H^+}{K''_b} \right) + k_3 \left( 1 + \frac{H^+}{K'_b} \right) \right]} \quad (6)$$

Dans le cas de l'hydrolyse trypsique d'ester non spécifique,  $k_2$  est alors très inférieur à  $k_3$  (Béchet et coll., 1966).

- Pour les esters spécifiques benzoyl L arginine éthyl ester (BAEE) et paratoluène sulfonyl L arginine méthyl ester (TAME) on note une activation par le substrat (Throwbridge et coll., 1963 - Béchet et coll., 1964) qui se traduit par une augmentation de la constante de vitesse de la réaction et de la constante de Michaelis apparente. Dans la zone où l'activation par le substrat se manifeste les cinétiques peuvent être de la forme :

$$v = \frac{a(S) + b(S)^2}{1 + c(S) + d(S)^2} e \quad (7)$$

où  $a$ ,  $b$ ,  $c$  et  $d$  sont des constantes dans des conditions de pH et de température bien déterminées. Dupaix (1969) discute les diverses explications possibles de ce phénomène (deux formes d'enzyme fixant avec des affinités différentes le substrat, ou deux sites de fixation sur une seule forme d'enzyme ayant des affinités différentes pour l'effecteur). A l'heure actuelle il n'est pas encore possible de dire avec certitude quel est le modèle valable.

## 2 - Amides. =====

Dans le cas des substrats amides spécifiques de la trypsine, benzoyl L arginine amide (BAA) et paratoluène sulfonyl L arginine amide (TAA), Chevallier et coll. (1966) ont montré que, comme pour la chymotrypsine (Zerner et coll., 1964 a et b), l'étape d'acylation était limitante :  $k_2 < k_3$ . On pourra donc écrire :

$$k_{2 \text{ app}} = \frac{k'_1 k_2}{k'_1 + k_2}$$



et, en fonction du pH (aux pH alcalins où nous avons testé l'activité enzymatique - schéma cinétique 2c) :

$$k_2 \text{ app (pH)} = \frac{k_1' k_2}{k_1' \left(1 + \frac{K_a''}{H^+}\right) + k_2 \left(1 + \frac{K_a'}{H^+}\right)} \quad (8)$$

ainsi que

$$K_S \text{ app} = K_S \frac{k_2}{k_1' + k_2}$$

et en fonction du pH :

$$K_S \text{ app (pH)} = K_S \frac{k_2 \left(1 + \frac{K_a}{H^+}\right)}{k_1' \left(1 + \frac{K_a''}{H^+}\right) + k_2 \left(1 + \frac{K_a'}{H^+}\right)} \quad (9)$$

### C) Principe du dosage du site actif de l'enzyme.

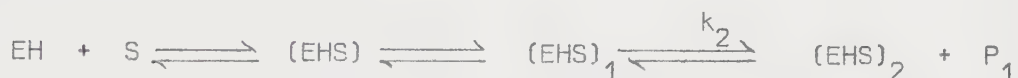
Il est important de savoir si tout l'enzyme, dont on évalue la concentration par spectrophotométrie, est actif. Il est en effet possible que l'enzyme soit partiellement dénaturé sans que cela se traduise dans la mesure de la densité optique à 260 mμ. Si au cours d'une transformation chimique on observe, par exemple, une diminution d'activité de l'enzyme sur un substrat spécifique en fonction du temps de réaction, cela peut être dû soit à une variation de la constante d'affinité de l'enzyme transformé chimiquement, soit à une modification de la constante de vitesse, soit à une destruction du site actif.

Le seul moyen de lever l'incertitude est d'évaluer le pourcentage de site actif de l'enzyme en fonction du temps de réaction. Nous avons conduit cette opération au pH optimum (schéma 2a). On se place dans les conditions où  $P_1$  est chromophore avec  $(S) \gg K_{m \text{ app}}$ ,  $k_2 \gg k_3$  et  $E_0 \ll (S)$ . Si cela est réalisé, pour une mole d'enzyme totalement actif dans le milieu on obtiendra une mole de  $P_1$ . S'il est assez aisé d'avoir un premier produit chromophore (paranitrophénol) et de travailler dans des conditions où  $E_0 \ll (S)$ , les deux autres conditions sont



les plus difficiles à remplir.

En effet pour que le pourcentage de site actif mesuré corresponde bien à la réalité, il est nécessaire que  $k_2 \gg k_3$  (étape d'acylation beaucoup plus rapide que l'étape de désacylation) ; un rapport de 50 fois est nécessaire. L'idéal serait que  $k_3 = 0$ , c'est-à-dire que l'on ait le schéma cinétique suivant :



Il y a, dans la littérature, de nombreux exemples d'inactivation par acylation de la sérine du site actif, permettant de titrer le pourcentage de site actif de l'enzyme. Citons, en particulier, dans le cas de la trypsine, le travail de Mares-Guia et coll. (1967) avec l'éthyl paraguainidinobenzoate. Des expériences effectuées au laboratoire par D. Thusius permettent de penser qu'il est possible de former un acylenzyme stable à partir de l'ester paranitrophénylique de l'acide anthranilique comme le font Haugland et coll. pour la chymotrypsine (1967). La concentration de paranitrophénol apparue est reliée directement à la quantité d'enzyme actif dans la solution.

D'autres auteurs, en particulier Bender et coll. (1966) ont titré la quantité de site actif de la trypsine par le paranitrophénylacétate et par le paranitrophényl  $N^2$  benzoylcarbonyl L lysinate plus spécifique de l'enzyme. Pour ces esters  $k_2 > k_3$ . Nous avons utilisé plus particulièrement le paranitrophénylacétate dans des conditions diverses. Nous allons discuter les avantages et les inconvénients de ce substrat.

Le paranitrophénylacétate n'est pas un substrat spécifique de la trypsine. Les paramètres cinétiques d'hydrolyse de ce produit par l'enzyme varient sensiblement suivant les auteurs. Steward et Ouellet (1959) donnent une valeur de  $K_m$  de l'ordre de  $2,1 \cdot 10^{-2}$  M et un rapport  $k_2/k_3$  de 100 à pH 7,8 dans 20 % d'alcool isopropylique ; Bender et coll. (1966) évaluent  $K_m$  à  $10^{-5}$  M et  $k_2/k_3$  à 15,2 à pH 7. Si le  $K_m$  est de  $2,1 \cdot 10^{-2}$  M, travaillant à des concentrations en substrats de l'ordre de  $10^{-2}$ , nous serons dans le cas où  $K_m \gg (S)$ . Si  $k_2/k_3$  est de 15,2, ce rapport est trop faible et l'extrapolation imprécise au temps zéro.



L'utilisation du NPA n'est donc pas recommandée si l'on veut des évaluations absolues de l'activité de la trypsine. En fait, ce qui nous intéresse, c'est une mesure relative du pourcentage de site actif ; nous plaçant dans des conditions données (400 mμ, pH 8, 25° , (S) =  $10^{-2}$  M, 5 % d'acétonitrile), nous comparerons les valeurs obtenues par extrapolation au temps zéro, avec les formes diversement modifiées de l'enzyme. Cette opération nous permettra de savoir si le site actif de l'enzyme a été détruit ou modifié au cours de la transformation chimique. C'est pourquoi nous avons utilisé ce substrat, produit courant, facile à purifier et stable assez longtemps en solution dans l'acétonitrile distillé. Ce titrage de l'activité "vraie" de l'enzyme est absolument indispensable lorsque l'on transforme chimiquement un enzyme. Nous sommes conscients des insuffisances de cette méthode de mesure qui, tout en nous donnant des valeurs relatives du pourcentage d'activité vraie, ne nous procurera pas beaucoup de renseignements sur l'état du site actif considéré dans son ensemble (site de fixation du substrat et site catalytique).

#### Utilisation de ces méthodes cinétiques.

Béchet (1965) a étudié l'influence du pH sur l'hydrolyse des substrats BAEE et TAME. Nous ne discuterons pas des techniques abondamment décrites dans la littérature. Nous nous sommes contentés d'utiliser ces substrats, d'une part *pour* la mesure de l'activité de nos solutions d'enzyme au pH optimum, d'autre part pour l'étude du comportement de la N ε acétyltrypsine en fonction de la force ionique entre pH 6 et 9, enfin pour la détermination du phénomène d'activation par le substrat au pH optimum.

Nous avons donc étudié l'hydrolyse du benzoyl L arginine amide (BAA) et du paratoluène sulfonyl L arginine amide (TAA), substrats non chromophores. Par la méthode de Moore et Stein (1948), nous dosons le produit  $P_1$  ( $NH_3^+$ ) apparu en fonction du temps, au cours de la réaction d'hydrolyse de ces substrats par la trypsine.

Nous avons progressivement modifié la technique de prélèvements en fonction du temps pour pouvoir réaliser des mesures rapides. Nous pouvons désormais suivre la cinétique 15 secondes après l'addition de l'enzyme dans le milieu réac-



tionnel et faire des prélèvements toutes les 15-20 secondes. Les concentrations d'enzyme nécessaires sont de l'ordre de 30  $\mu\text{g}$  à 70  $\mu\text{g}$  par ml suivant la nature du substrat, sa concentration et le pH où l'on travaille.

En utilisant les amides, nous obtenons des paramètres cinétiques moins apparents qu'en étudiant l'hydrolyse des esters. La constante d'acylation apparente ( $k_{2 \text{ app}}$ ) et la constante de Michaelis  $K_s$  sont, au pH optimum, les paramètres cinétiques réels de la réaction d'hydrolyse. Aux pH alcalins, ceci n'est plus vérifié si l'on admet que  $k_1'$  varie avec le pH (voir la discussion). Les constantes alors déterminées deviennent "apparentes" mais sont encore assez facilement calculables.

En mesurant l'activité amidasique et estérasique à l'aide de substrats différents seulement par leur groupe hydrolysable (BAA-BAEE, TAA-TAME), il est possible d'obtenir des renseignements précis sur  $k_2$  et  $k_3$ ,  $K_m$  et  $K_s$ . S'il est assez difficile d'obtenir des valeurs "vraies" des paramètres cinétiques d'hydrolyse de ces substrats, il paraît néanmoins évident que ces études sont le seul moyen facile dont nous disposons pour évaluer l'effet d'une transformation chimique sur la protéine. Les résultats que l'on obtient, même s'ils ne traduisent pas toujours simplement la réalité, sont autant d'éléments qui orientent nos recherches.



*D E U X I E M E P A R T I E*

*MODIFICATIONS CHIMIQUES*

---



## DEUXIEME PARTIE - MODIFICATIONS CHIMIQUES

### I - Description de la N $\epsilon$ acétyltrypsine.

La N  $\epsilon$  acétyltrypsine est la forme modifiée de la trypsine qui nous a servi comme point de départ pour toutes les autres modifications chimiques. Elle a été préparée par Labouesse et coll. (1966). La trypsine native est traitée à pH 6,8 à 0° en présence de  $\text{CaCl}_2$   $2 \cdot 10^{-3}$  M par l'anhydride acétique 10 M (1 % en volume final). Le pH est maintenu par addition de soude 6 N jusqu'à hydrolyse complète du réactif d'acétylation. Après précipitation fractionnée par  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  et chromatographie sur DEAE-cellulose la protéine obtenue est traitée par l'hydroxylamine 0,5 M pour désacétyler les tyrosines qui seraient encore substituées (voir discussion des méthodes expérimentales). On vérifie chimiquement par le réactif de Sanger que seuls ses résidus lysines sont bloqués par acétylation. Dans ce chapitre, après avoir étudié la stabilité tout-à-fait particulière de cette forme d'enzyme et avoir discuté les raisons de ce phénomène, nous aborderons la description de l'état des groupes chromophores accessibles de la protéine et les caractéristiques cinétiques qui président à son activité.

### A - Stabilité de l'enzyme acétylé sur les $\epsilon$ $\text{NH}_2$ des lysines :

Nous n'avons pas fait d'études systématiques de cette question ; Spotorno en discute dans sa thèse (1969). Nous nous sommes contentés d'étudier la stabilité de l'enzyme dans les différentes conditions où nous l'avons placé lorsque nous l'avons modifié chimiquement, ou lorsque nous avons étudié l'état de ses chromophores par spectrophotométrie de différence. Nous présentons, dans le tableau 1, les résultats que nous avons obtenus au cours des différentes mesures de stabilité. Nous donnons aussi les motifs pour lesquels nous nous sommes placés dans ces conditions. Nous pouvons donc dire :

i) qu'à des pH supérieurs à 6 la trypsine acétylée est stable (sauf dans des conditions extrêmes : urée 6 M par exemple). Nous estimons que cela peut



|                                                                    | CONDITIONS DE LA MESURE DE STABILITE                                                    | TEMPS DE LA<br>MESURE DE<br>STABILITE | RESULTAT                                                         | BUT DE L'ETUDE                                                            |
|--------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| Comportement de<br>la N ε acétyl-<br>trypsine à diffé-<br>rents pH | pH 6 - N ε acétyltrypsine : 1 mg/ml<br>température de la pièce                          |                                       | Précipitation<br>immédiate                                       | Démalsinisation de l'α<br>:NH <sub>2</sub>                                |
|                                                                    | pH 7 - phosphate 0,1 M, 20°<br>0,5 mg/ml < Neacétyltrypsine < 3 mg/ml                   | 4 heures                              | Stable                                                           | Acétylation par l'acétyl-<br>imidazole - mesures<br>spectrophotométriques |
|                                                                    | pH 7,5 - DMSO 20 % et 40 %, 20°<br>0,5 mg/ml < Neacétyltrypsine < 1 mg/ml               | 2 heures                              | Stable                                                           | Acétylation de l'α NH <sub>2</sub><br>terminal                            |
|                                                                    | pH 9 - Tampon Tris 0,05 M, 20°<br>0,5 mg/ml = N ε acétyltrypsine                        | 2 heures                              | Stable                                                           | Mesures spectrophoto-<br>métriques                                        |
|                                                                    | pH 9,5 et 10 - 10 % ETOH, 2°.<br>N ε acétyltrypsine = 3 mg/ml                           | 10 heures                             | Stable                                                           | Méthylation des tyrosines                                                 |
|                                                                    | Urée 4 M ou 6 M, pH 7,4 et 6,9, 20°<br>Dialyse à 0°<br>N ε acétyltrypsine = 0,895 mg/ml | 1 heure                               | Stable en urée<br>4 M, diminution<br>de 25 à 30 % en<br>urée 6 M | Acétylation de l'α NH <sub>2</sub> de<br>l'isoleucine N terminale         |
|                                                                    | Hydroxylamine - 0,5 M pH 7,5, 20°<br>- M pH 7,5, 20°                                    | 2 heures<br>1 heure                   | Stable<br>La stabilité<br>dégroît après 1<br>heure de manip.     | Hydroxylaminolyses<br>de la liaison<br>- N-O-AC<br>H                      |
|                                                                    | Hydroxylamine 0,5 M - Urée 2 M<br>pH 7,5, 20°                                           | 1 heure                               | Stable                                                           |                                                                           |
|                                                                    | Nitrosacétone 0,5 N, pH 7,5, 0°                                                         | 1 heure                               | Stable                                                           |                                                                           |
|                                                                    |                                                                                         |                                       |                                                                  |                                                                           |

L'activité de l'enzyme est mesurée en utilisant le BAEE comme substrat à pH 8,5, T 25°, μ = 0,1.



venir de ce que la N  $\epsilon$  acétyltrypsine ne peut pratiquement plus s'autolyser. En effet, les 14 résidus lysines alors bloqués ne peuvent plus servir de substrat pour l'enzyme ; il ne reste qu'une liaison Arg-Val susceptible d'être hydrolysée (Maroux et coll., 1966) et certainement moins accessible que les autres liaisons autolysables.

ii) qu'aux pH inférieurs à 6 la précipitation immédiate de la protéine est due certainement à l'abaissement du point isoélectrique de la molécule lorsque les charges positives des  $\epsilon$  aminés des lysines sont supprimées par acétylation. La modification importante de la charge globale de l'enzyme provoque son instabilité aux pH acides.

#### B - Etat des chromophores tyrosines et tryptophanes de la N $\epsilon$ acétyltrypsine.

Nous nous sommes intéressés à l'état des groupements chromophores, et plus particulièrement des tyrosines, dans la N  $\epsilon$  acétyltrypsine pour deux raisons. D'une part, pour savoir dans quelle mesure on pouvait comparer la N  $\epsilon$  acétyltrypsine avec la trypsine et d'autre part, pour déterminer éventuellement le nombre de groupes tyrosines accessibles aux réactifs chimiques. Nous avons discuté plus haut les limites des méthodes que nous avons utilisées : le titrage spectrophotométrique et les perturbations de solvant.

Théoriquement, nous utilisons, pour exploiter nos résultats, la théorie des interactions multiples (pour une revue détaillée de cette question, cf. Yon, 1969) établie dans le cas d'une protéine P susceptible de fixer un ou plusieurs ions (A) sur différents sites équivalents et indépendants. En écrivant les constantes de dissociation des divers équilibres entre les sites de la protéine et les ions, il est possible de déterminer, d'une part une seule constante d'association intrinsèque K qui est la même pour tous les sites récepteurs, d'autre part le nombre moyen de sites occupés. Dans notre cas les tyrosines de la N  $\epsilon$  acétyltrypsine constituent les sites de fixations des ions hydrogènes, équivalents mais dépendants par des interactions électrostatiques. Le principe de



calcul, que nous ne développerons pas ici, revient à dire que le travail nécessaire pour fixer un nouvel ion sur l'enzyme est proportionnel à la charge nette de la protéine et au coefficient d'interaction électrostatique. Dans le cas du titrage des groupes d'une même catégorie (groupes phénoliques de tyrosine par exemple), nous aurons :

$$K_i = \frac{\alpha_i (H^+)}{1 - \alpha_i} K_0 e^{2wZ}$$

ou encore

$$pH - \log \left( \frac{\alpha_i}{1 - \alpha_i} \right) = pK_0 - 0,868 wZ \quad (1)$$

(connue sous le nom de relation de Linderstrom-Lang), avec  $\alpha_i$  degré de dissociation moyen,  $K_i$  constante d'ionisation des groupes phénoliques,  $Z$  la charge nette de la protéine,  $w$  le coefficient d'interaction électrostatique,  $K_0$  la constante d'ionisation de ces groupes à force ionique ( $\mu$ ) nulle. La relation de Linderstrom-Lang implique que la protéine est assimilable à une sphère uniformément chargée. Comme naturellement ce n'est pas le cas, elle est considérée comme une formule empirique. Cette relation nous servira pour interpréter les courbes de titrage des tyrosines et en déduire les  $pK$  intrinsèques et les valeurs du coefficient électrostatique  $w$  dans le cas où cela est possible.

#### 1°) Titrage spectrophotométrique.

a) Sur la figure 2, nous présentons la courbe de titrage des tyrosines de la N  $\epsilon$  acétyltrypsine à 25°,  $\mu = 0,1$ , les densités optiques étant déterminées à 300 m $\mu$ . On peut observer sur la courbe un  $pK$  apparent de 10,9. La zone de titrage irréversible commence à 11,3. On peut essayer de déterminer le  $pK$  vrai des groupes que l'on titre à partir de la relation (1). Si l'on porte graphiquement

$$pH - \log \frac{\alpha}{1 - \alpha} = f(Z)$$

où  $Z$  est la charge de la protéine que l'on calcule à chaque pH à partir des valeurs des  $pK$  intrinsèques données pour le trypsinogène de boeuf (Delaage et



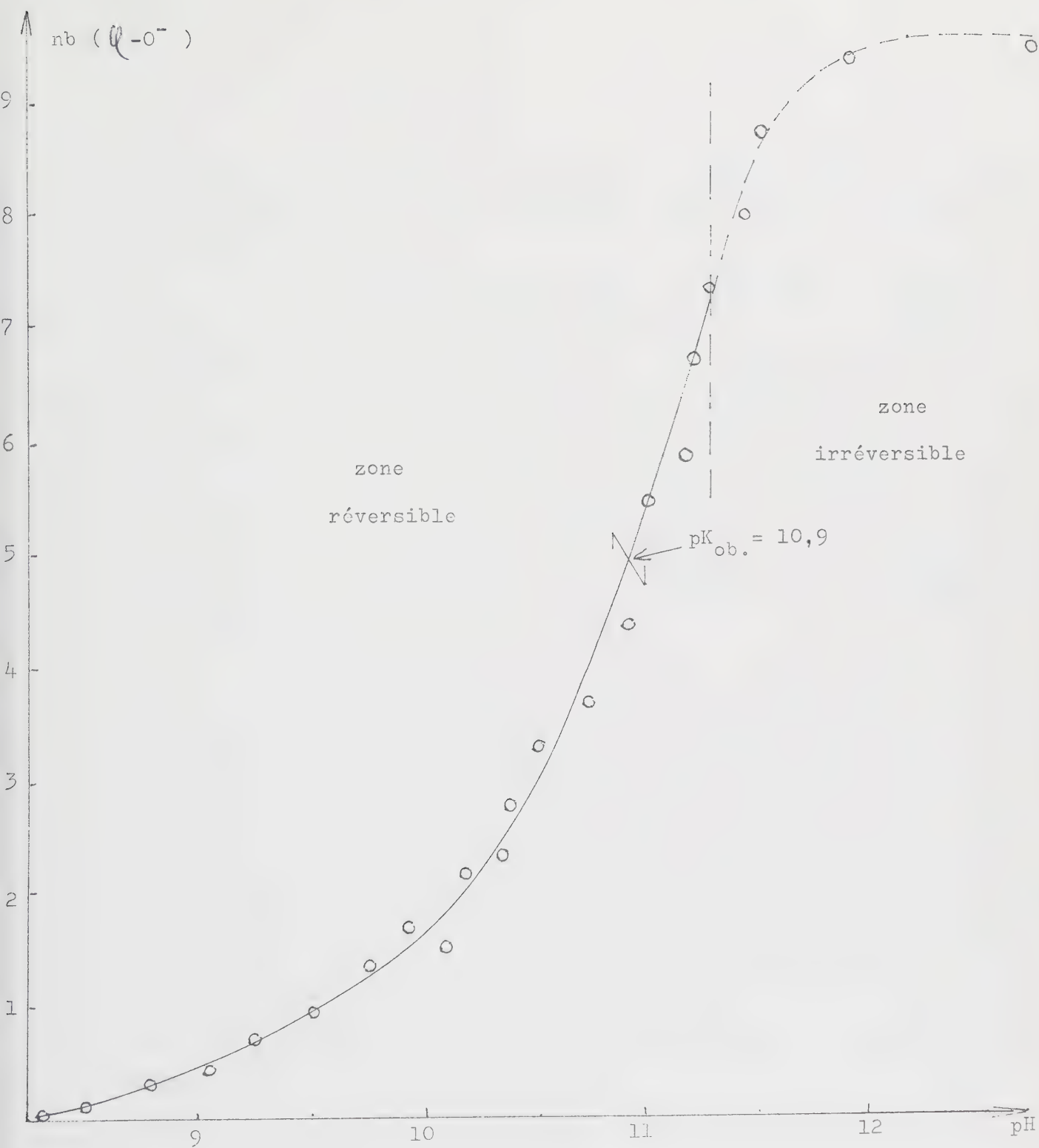


Figure : 2:

Courbe de titrage des tyrosines de la TAC en fonction du pH ,  
à  $25^\circ$  et  $\mu = 10^{-1}$ .



coll., 1965), en extrapolant à charge nulle, nous pouvons obtenir le pK intrinsèque des tyrosines et la pente de la droite donne la valeur du coefficient électrostatique  $w$ .

Nous avons représenté sur la Figure 3 les résultats que l'on obtient pour le titrage des tyrosines de la N $\epsilon$  acétyltrypsine à  $\mu = 0,1$ . Immédiatement il apparaît que les points de la droite  $\text{pH} - \log \frac{\alpha}{1-\alpha} = f(Z)$  ne s'alignent pas ; il est donc difficile de déterminer le pK intrinsèque et la valeur de  $w$ . On peut dire que, dans le cas de cette forme modifiée de l'enzyme, les tyrosines titrables réversiblement (jusqu'à pH 11,3) s'ionisent successivement les unes après les autres et qu'il n'est ainsi pas possible de les distinguer par leur pK d'ionisation. Les résultats de titrages à différentes forces ioniques présentés par Arnould (1967) renforcent cette conclusion ; on pourra simplement déterminer un pK apparent traduisant l'ionisation d'un groupe de 4 ou 5 tyrosines titrables réversiblement.

Les résultats que nous donne l'action de l'urée sur les courbes de titrages sont plus conformes à la théorie. L'urée perturbe profondément la structure de la molécule en modifiant sa conformation. Les groupes masqués dans la protéine se trouvent alors dans un même environnement que les groupes qui étaient en contact avec le solvant. L'homogénéité qui en résulte agit sur les valeurs des pK. D'autre part ces groupes masqués passent dans un milieu de constante diélectrique plus élevée ; celle de l'urée (Castenada Agullo et coll., 1959). Les valeurs des pK moyens seront donc abaissées. A la limite si tous les groupes phénoliques des tyrosines sont dévoilés pour une force ionique extrapolée à zéro et à une température de 25°, les pK doivent être de 10 (Edsall et coll., 1958). Les résultats que nous obtenons pour le titrage des tyrosines avec ou sans urée sont rassemblés dans le tableau ci-dessous :

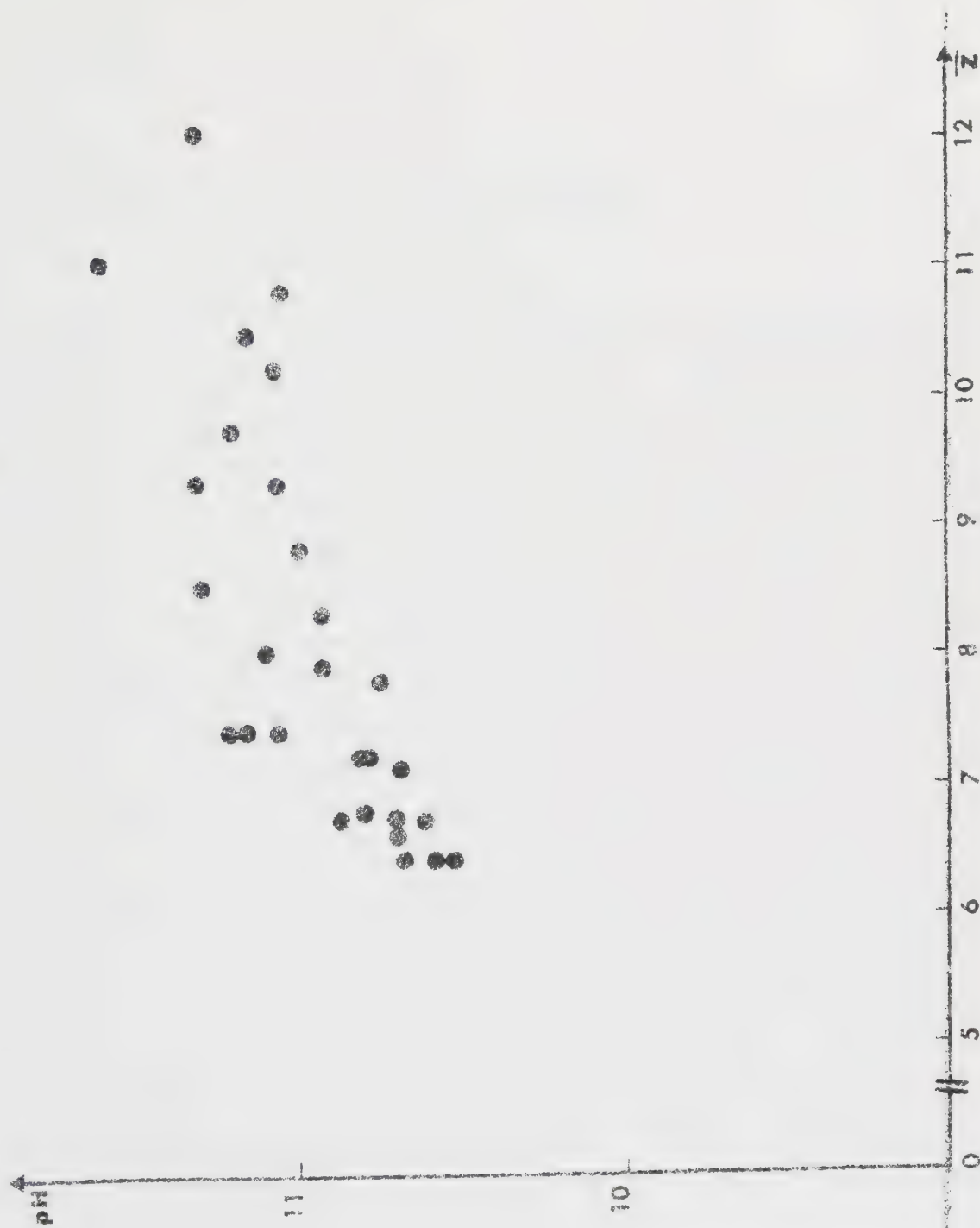
| <u>Conditions</u> | <u>pK_moyen</u> |
|-------------------|-----------------|
| urée 6 M          | 10,2            |
| urée 4 M          | 10,4            |
| sans urée         | 10,9            |



Figure 3 : Détermination du pK intrinsèque et du facteur w pour la N e acétyltrypsine..

$T = 25^{\circ}$  ,  $\mu = 0,1$  . Les densités optiques sont mesurées à 300 m $\mu$ .

$Z$  a été calculé d'après les données de Delaage et coll. (1965).





et dans la Figure 4; on remarque qu'une concentration de 4 M en urée ne perturbe pas fortement la structure de la molécule, tout au moins dans l'entourage des tyrosines.

Ces résultats nous permettent de comparer la trypsine native et la trypsine acétylée. Nous avons représenté sur la Figure 5 les courbes de titrage obtenues pour la trypsine native par d'Albis et coll. (1967) et celle déterminée pour la trypsine acétylée dans des conditions presque identiques. Le comportement des tyrosines semble différent pour les deux formes d'enzyme. Pour la trypsine on peut distinguer deux groupes : un premier groupe d'environ 5 tyrosines titré réversiblement dont le pK apparent se situe vers 10,3 et un second titré irréversiblement. Pour la trypsine acétylée cette distinction n'est plus possible. Cependant, il faut ajouter que les 5 premières tyrosines doivent avoir des pK intrinsèques légèrement différents puisque pour la trypsine native la représentation de Linderstrom-Lang ne donne pas non plus une droite.

Nous ne pensons pas que cette différence soit fondamentale. En effet la zone de titrage irréversible commence pour la même valeur du pH (11,3) et pour le même nombre de tyrosines dévoilées (4 à 5) pour les deux formes d'enzyme. La conclusion qui vient à l'esprit est que l'acétylation des lysines, en modifiant la charge globale de la protéine (donc en perturbant les interactions électrostatiques possibles entre les groupes chargés des lysines et les résidus phénoliques), supprime les différences de pK entre les tyrosines accessibles au proton sans destruction de la structure tertiaire de la protéine.

L'influence de l'urée sur le comportement des tyrosines semble plus marquée pour la trypsine native que pour la trypsine acétylée même en urée 6 M (Inada, 1961). Ceci voudrait dire que la trypsine acétylée est plus résistante à la perturbation par l'urée que la trypsine native et qu'il semble difficile d'abaisser le pK des tyrosines au-dessous de pH 10,2. Donc il paraît certain que les tyrosines libres de la trypsine acétylée sont perturbées par le changement de charge nette de la protéine qui résulte de cette modification chimique. Cependant cette différence ne doit pas influencer énormément sur la réactivité de ces groupes.



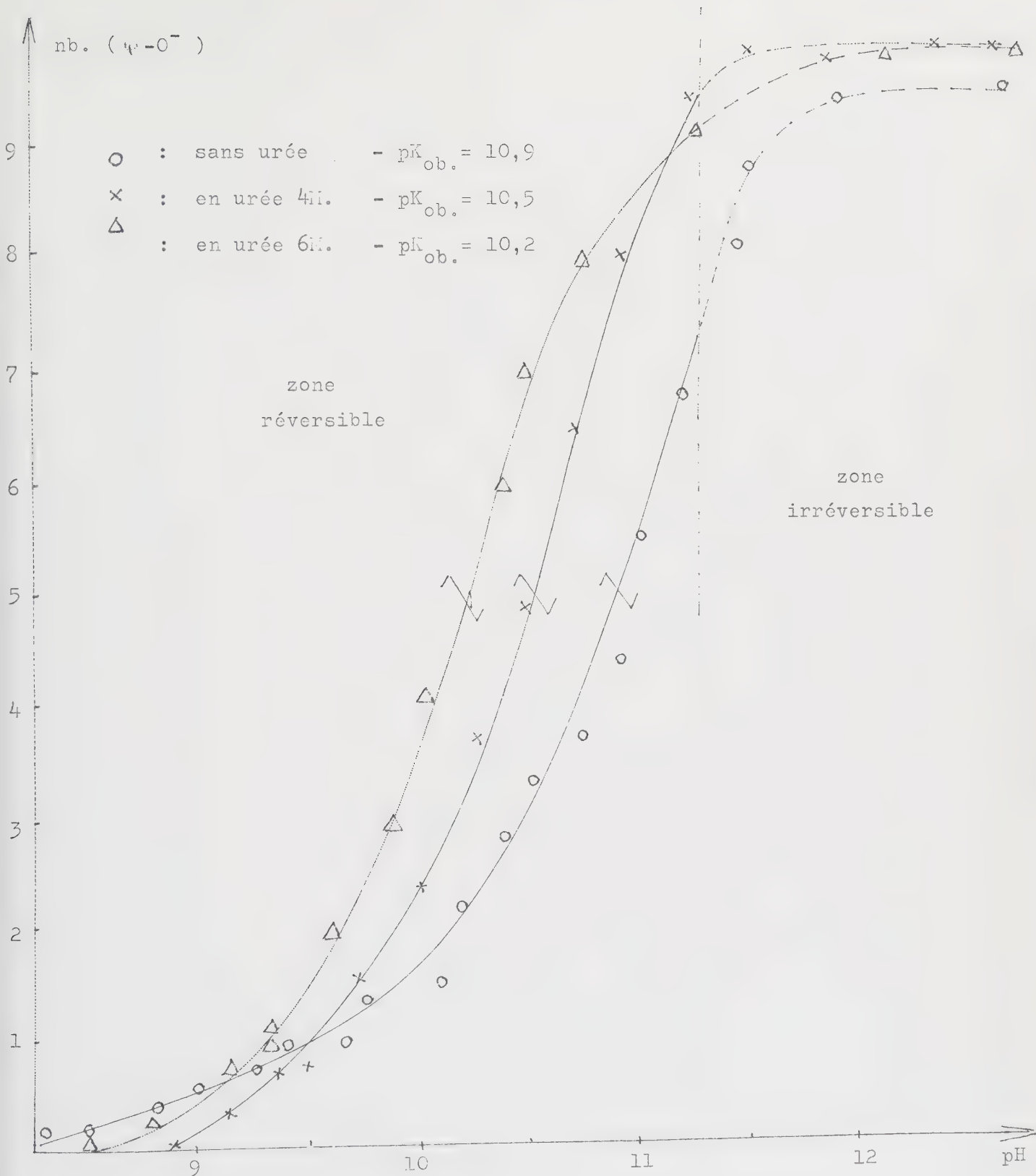


Figure : 4

Courbe de titrage des tyrosines de la TAC en fonction du pH à force ionique constante ( $\mu = 0,1$ ), en présence et ~~non~~ d'urée .

Graphique



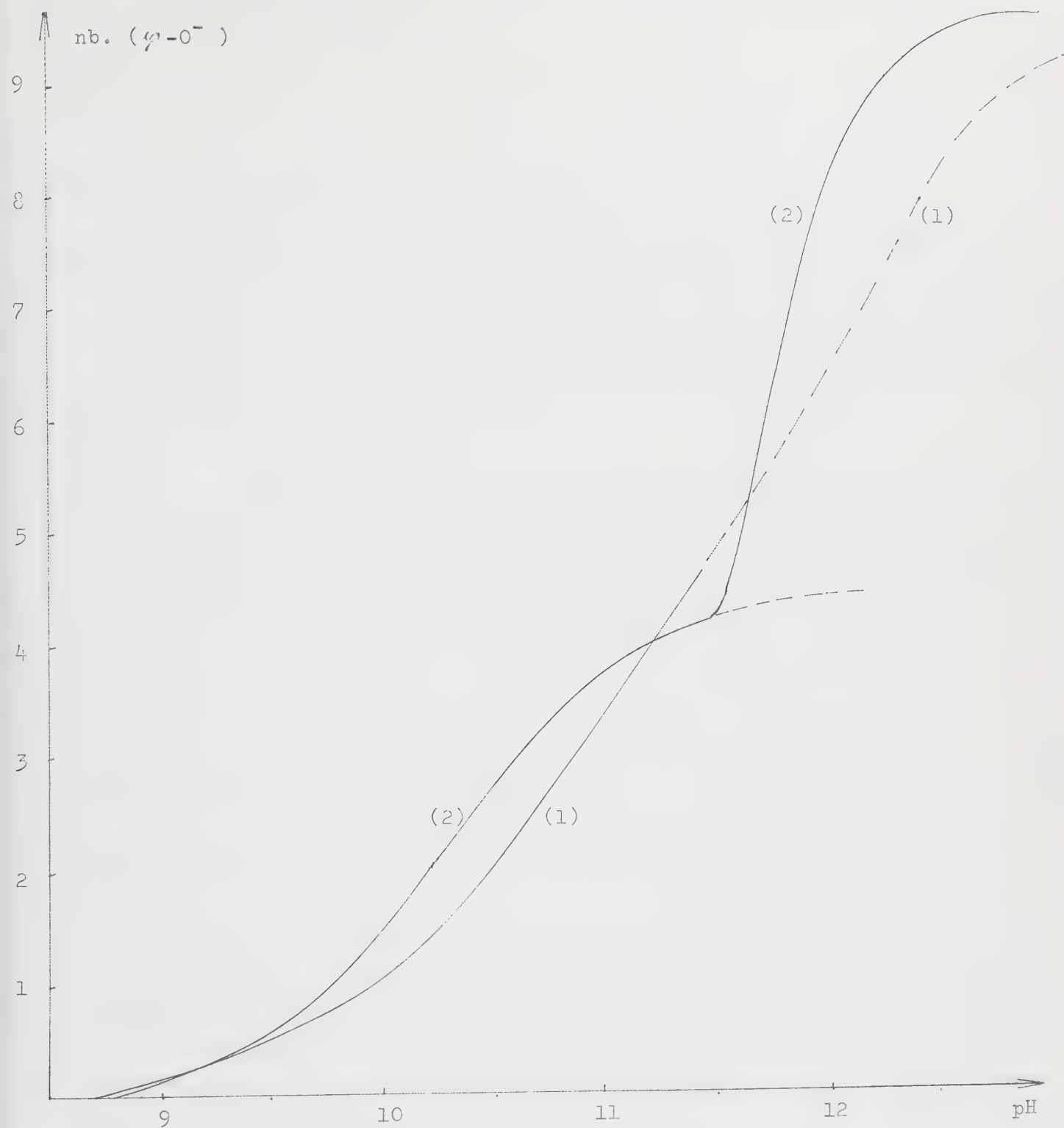


Figure : .5

Courbe de titrage des tyrosines en fonction du pH :

(1) de la trypsine acétylée, à 25° et  $\mu = 2,2 \cdot 10^{-1}$ ;

(2) de la trypsine native , à 25° et  $\mu = 3,0 \cdot 10^{-1}$ .



## 2°) Perturbation par le solvant.

Estimant que les titrages spectrophotométriques ne nous avaient pas donné de résultats suffisamment nets, nous avons tenté de préciser le nombre de tyrosines de la N  $\epsilon$  acétyltrypsine accessibles au solvant en perturbant le spectre de ces résidus par l'éthylène glycol et le saccharose. Dans le chapitre "Techniques spectrophotométriques" nous avons précisé les limites de ce que l'on pouvait attendre de ces expériences.

- Etudes sur des modèles. Nous donnons dans le tableau suivant les valeurs des différences d'absorption au maximum des spectres de perturbation déterminés sur des modèles N-acétyltyrosine amide (NATA) et N-acétyltryptophane amide (NATRA) lorsqu'on opère avec des solutions à 20 % (v/v) d'éthylène glycol ou de saccharose dans l'eau en tampon phosphate 0,05 M, pH 7.

|                               | <u>NATA</u>              |         | <u>NATRA</u>             |         |
|-------------------------------|--------------------------|---------|--------------------------|---------|
|                               | $\Delta\epsilon$ molaire | m $\mu$ | $\Delta\epsilon$ molaire | m $\mu$ |
| éthylène glycol<br>20 % (v/v) | 100                      | 284     | 300                      | 291     |
|                               | 105                      |         | 180                      | 283     |
| saccharose<br>20 % (v/v)      | 100                      | 285     | 300                      | 291     |
|                               |                          | 286     |                          | 293     |

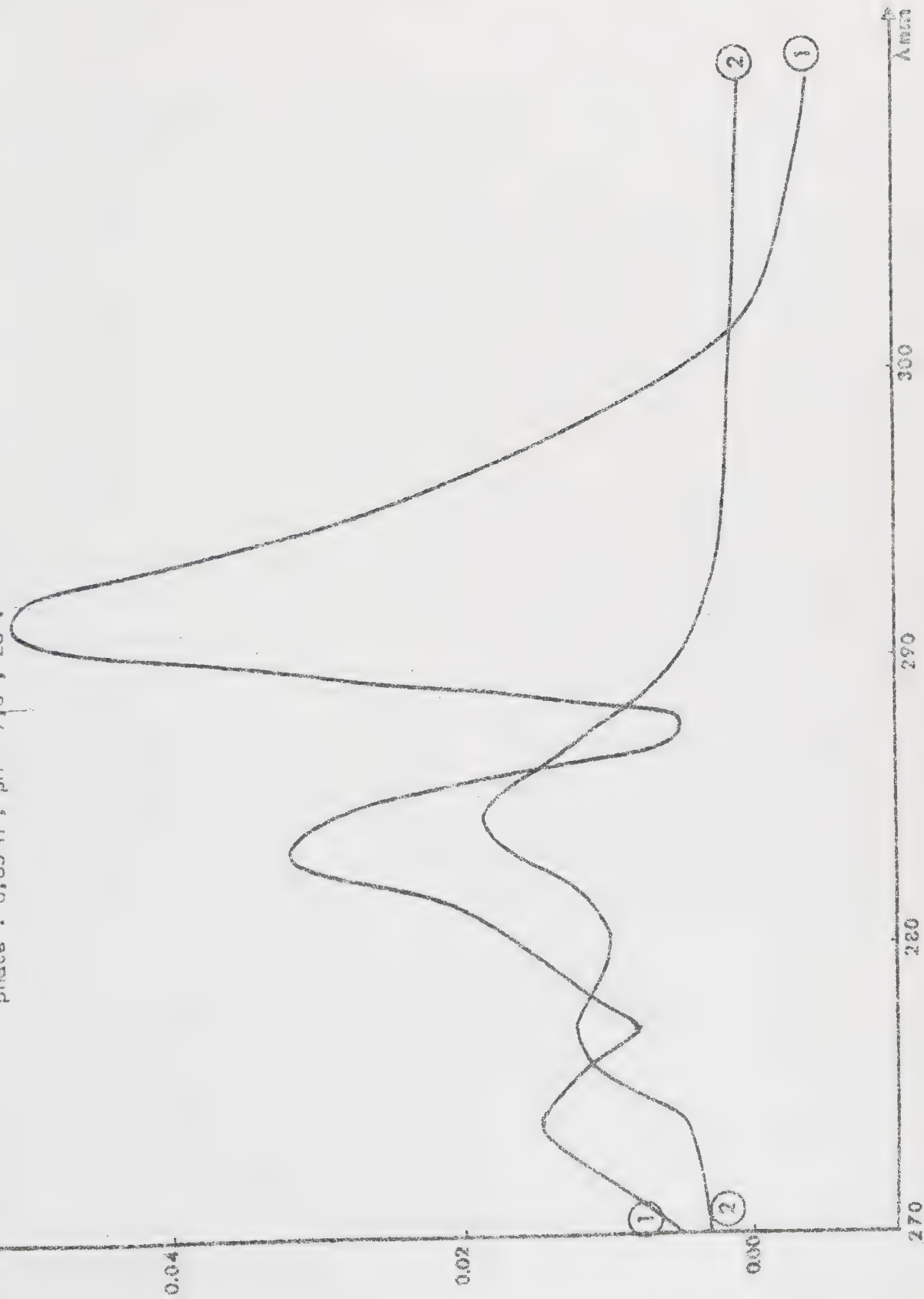
Avec la Figure 6, nous présentons les spectres de perturbation par l'éthylène glycol des deux modèles à des concentrations de  $1,7 \cdot 10^{-4}$  M. Nous remarquons qu'à 292 m $\mu$  les résidus tyrosines n'absorbent pratiquement pas lorsqu'ils sont perturbés. Nous avons, par ailleurs, vérifié que les spectres de perturbation de chaque acide aminé étaient additifs en étudiant le spectre d'un mélange NATA/NATRA dans des proportions 5/1 en présence d'éthylène glycol. Connaissant les spectres de perturbation des modèles, sachant que leurs effets sont additifs, il nous sera possible, après avoir mesuré la concentration des solutions d'enzyme, de savoir combien de tryptophanes ont été perturbés et par différence d'évaluer le nombre de tyrosines accessibles au solvant.



Figure 6 :

Spectre de perturbation de la N acétyltrypsine amide (NATA) et de la N acétyltrypophane amide (NATRA).

NATA et NATRA :  $1,7 \cdot 10^{-4}$  M. Le perturbant est l'éthylène glycol 20% (v/v). Tampon phosphate : 0,05 M ; pH = 7,9 ; 20°.





- Etude sur la N  $\epsilon$  acétyltrypsine. Nous présentons sur la Figure 7 les résultats obtenus en perturbant l'enzyme  $5,1 \cdot 10^{-5}$  M à  $25^\circ$  en tampon phosphate 0,05 M, pH 7, par l'éthylène glycol à 20 %. On évalue à 1,6 le nombre de tryptophanes perturbés à 292 m $\mu$ . On peut donc obtenir par différence entre le spectre de l'enzyme et celui du tryptophane à la concentration de  $1,6.5,1 \cdot 10^{-5}$  M un spectre de différence correspondant uniquement aux tyrosines (en haut à gauche). Le nombre de tyrosines alors perturbées est compris entre 3,7 et 4,3.

Le spectre de perturbation de la N  $\epsilon$  acétyltrypsine par le saccharose est donné par la Figure 8. On peut déterminer que 1 tryptophane et 2,3 à 2,9 résidus tyrosines sont accessibles à ce solvant.

Herskovits et coll. (1962) admettent que ces deux perturbants ont des rayons efficaces différents : 4,7 Å pour le saccharose et 2,2 Å pour l'éthylène glycol. En suivant le raisonnement de ces auteurs on dira que le solvant possédant la plus grande "taille" (ici le saccharose) perturbera les résidus les plus accessibles à la surface de la protéine. De son côté l'éthylène glycol plus "petit" agira sur le spectre des résidus se trouvant d'une part à la surface de la protéine et d'autre part dans des "crevasses" dans lesquelles sa petite taille lui permettra d'entrer. Il est donc logique de perturber un plus grand nombre de chromophores avec l'éthylène glycol qu'avec le saccharose. Le côté descriptif de cette méthode de raisonnement ne nous échappe pas. On peut dire que l'éthylène glycol perturbe un résidu de plus que le saccharose. Nous comparerons plus loin ces résultats avec ceux que nous obtenons par les expériences de modifications chimiques.

### C - Comportement cinétique de la trypsine acétylée.

Pour achever la description de la N  $\epsilon$  acétyltrypsine nous avons étudié systématiquement :

- i) son comportement cinétique au pH optimum vis-à-vis de différents substrats spécifiques amides et esters,
- ii) l'influence de la force ionique sur son activité vis-à-vis de substrats esters spécifiques ou non,
- iii) et enfin son comportement aux pH alcalins lorsque l'enzyme hydrolyse une amide spécifique.



Figure 7 : Spectre de perturbation de la N  $\epsilon$  acétyltrypsine par l'éthylène glycol à 20% (v/v).

20° - Tampon phosphate 0,05 M , pH = 7,9.

Courbe du bas : (1) N  $\epsilon$  acétyltrypsine  $5,1 \cdot 10^{-5}$  M.

(2) NATRA  $5,1 \cdot 10^{-5}$  M  $\times$  1,6 ( le facteur 1,6 correspond au nombre de Tryptophane perturbé , mesuré à 290 - 292 m $\mu$  ).

Courbe du haut : Spectre de perturbation des tyrosines de la N  $\epsilon$  acétyltrypsine (obtenu en faisant la différence entre la courbe (2) et la courbe (1).

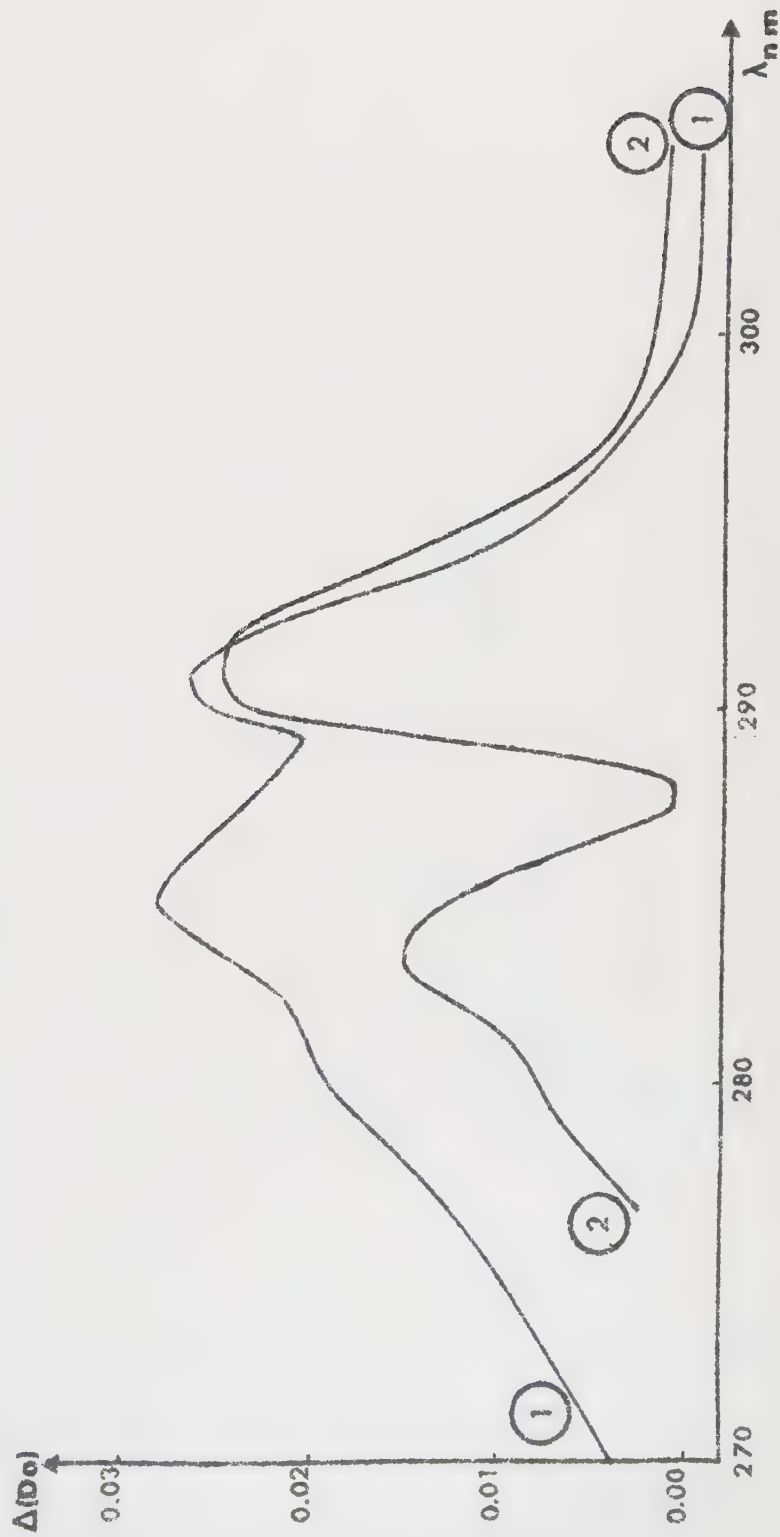
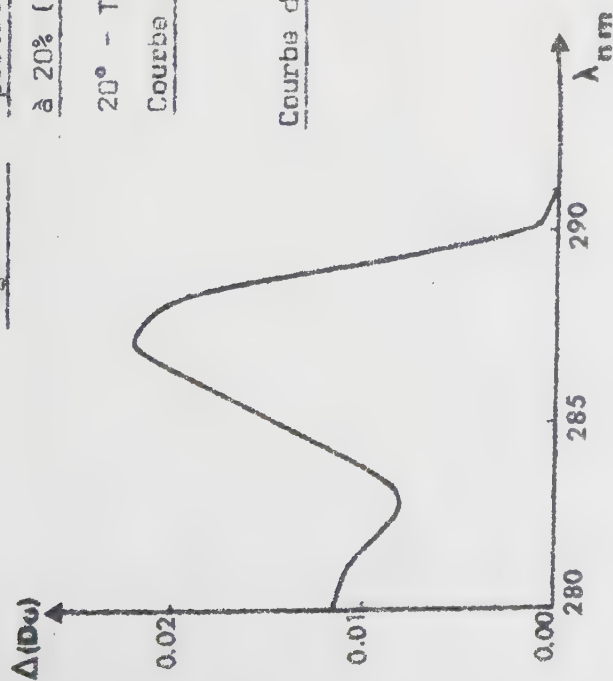
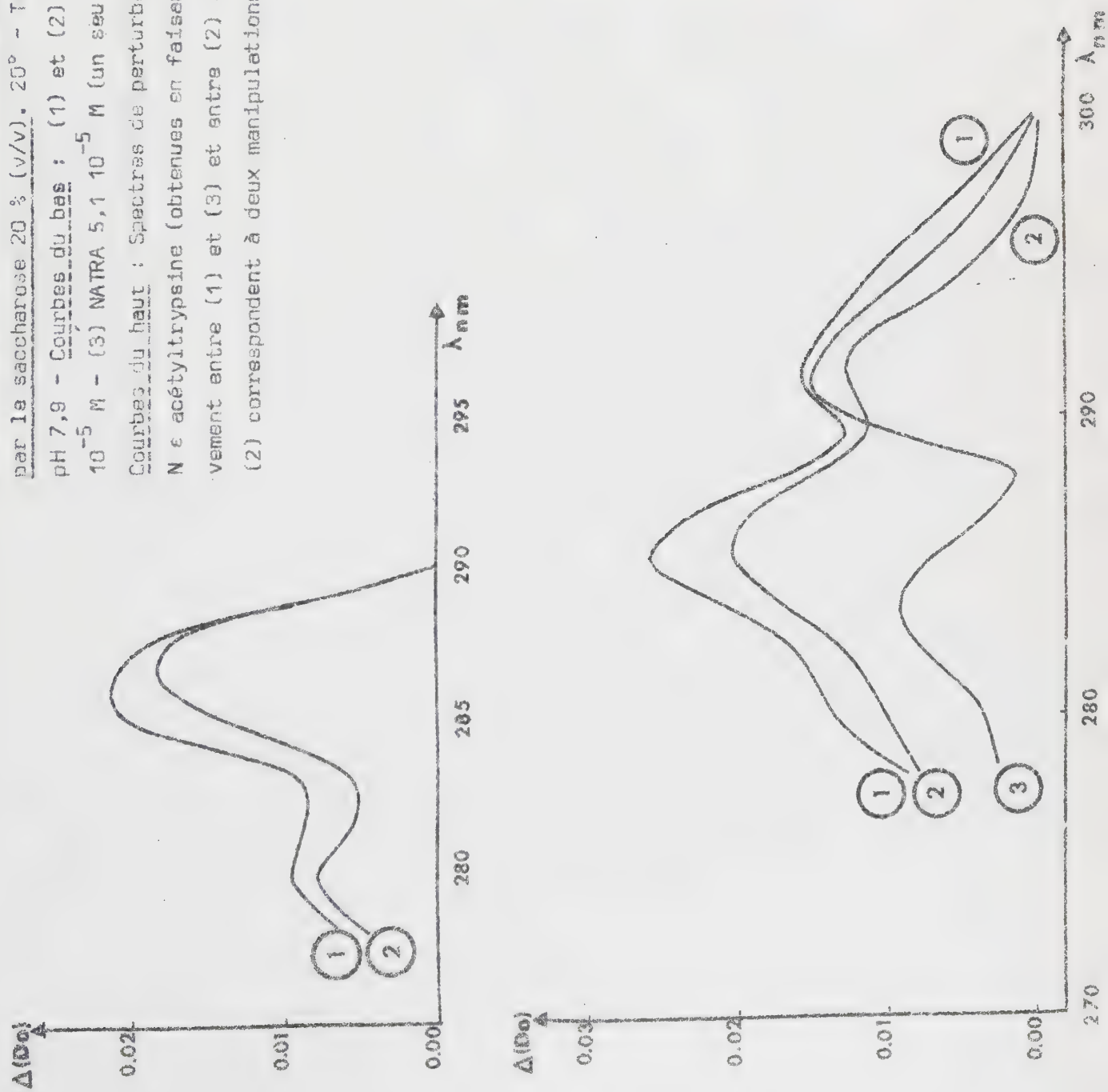




Figure 8 - Spectres de perturbation de la N  $\epsilon$  acétyltrypsine par la saccharose 20 % (v/v). 20° - tampon phosphate 0,5 M pH 7,9 - Courbes du bas : (1) et (2) N  $\epsilon$  acétyltrypsine 5,1  $10^{-5}$  M - (3) NATRA 5,1  $10^{-5}$  M (un seul tryptophane est perturbé). Courbes du haut : Spectres de perturbation des tyrosines de la N  $\epsilon$  acétyltrypsine (obtenues en faisant la différence respectivement entre (1) et (3) et entre (2) et (3). Les courbes (1) et (2) correspondent à deux manipulations différentes.





Nous avons déjà présenté les principaux schémas cinétiques et les limites de ces méthodes d'étude dans la partie expérimentale.

### 1°) Comportement de la N $\epsilon$ acétyltrypsine au pH optimum à $\mu = 0,1$ et $25^\circ$ .

Dans le Tableau 2 sont présentées les constantes cinétiques d'hydrolyse de substrats spécifiques amides et esters pour la trypsine native et pour la trypsine acétylée. Il est net que l'activité des deux formes d'enzyme, dans ces conditions, est la même. Les petites différences que l'on peut observer dans les constantes de Michaelis  $K_m$  app pour les esters et  $K_s$  app pour les amides ne sont pas, à notre avis, significatives. Ceci signifie que les charges positives des groupes  $\epsilon$  aminés des lysines n'ont pas d'influence sur l'affinité de l'enzyme pour les substrats spécifiques esters et amides de petit poids moléculaire, sinon nous aurions obtenu des constantes d'affinité très différentes pour la trypsine native et pour la trypsine acétylée. D'autre part nous notons que le phénomène d'activation par ce substrat se manifeste toujours de manière aussi nette pour les deux formes d'enzyme : les groupes  $\epsilon$  aminés des lysines ne sont pas impliqués dans ce phénomène.

### 2°) Etude avec des forces ioniques variables.

Béchet et coll. (1966) montrent que pour la trypsine il existe deux charges positives de l'enzyme en interaction avec l'histidine active de l'enzyme. Nous avons pensé que ces deux charges positives pouvaient être celles de groupes  $\epsilon$  aminés des lysines. Aussi avons-nous recommencé les mêmes mesures cinétiques que ces auteurs avec l'enzyme modifié. Cette étude a été effectuée avec des substrats esters spécifiques BAEE et TAME et avec un substrat ester non spécifique, l'acétyltyrosine éthyl ester (ATEE) (Inagami et coll., 1960).



Constantes cinétiques d'hydrolyse de substrats spécifiques amides et esters pour la trypsine native et pour la N $\epsilon$ -acétyltrypsine à pH = 8, 25° et  $\mu$  = 0,1.

| Enzyme                       | B A E E                              |                                                     |                                      |                                                     | B A A                                 |                                     |                                      |                                                     | T A M E                              |                                                     |                                       |                                     | T A A                                |                                                     |                                      |                                     |
|------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
|                              | (K <sub>m</sub> ) <sub>1</sub><br>mM | (k <sub>3</sub> ) <sub>1</sub><br>sec <sup>-1</sup> | (K <sub>m</sub> ) <sub>2</sub><br>mM | (k <sub>3</sub> ) <sub>2</sub><br>sec <sup>-1</sup> | K <sub>m</sub> = K <sub>s</sub><br>mM | k <sub>2</sub><br>sec <sup>-1</sup> | (K <sub>m</sub> ) <sub>1</sub><br>mM | (k <sub>3</sub> ) <sub>1</sub><br>sec <sup>-1</sup> | (K <sub>m</sub> ) <sub>2</sub><br>mM | (k <sub>3</sub> ) <sub>2</sub><br>sec <sup>-1</sup> | K <sub>m</sub> = K <sub>s</sub><br>mM | k <sub>2</sub><br>sec <sup>-1</sup> | (K <sub>m</sub> ) <sub>1</sub><br>mM | (k <sub>3</sub> ) <sub>1</sub><br>sec <sup>-1</sup> | (K <sub>m</sub> ) <sub>2</sub><br>mM | k <sub>2</sub><br>sec <sup>-1</sup> |
| Trypsine                     | 0,003*                               | 19*                                                 | 10*                                  | -                                                   | 2,4                                   | 1,09                                | 0,015**                              | 85**                                                | 65**                                 | 500**                                               | 2,5                                   | 1,9                                 |                                      |                                                     |                                      |                                     |
| N $\epsilon$ -acétyltrypsine | 0,003                                | 20                                                  | 9                                    | 31                                                  | 1,08                                  | 1,04                                | 0,014                                | 90                                                  | 42                                   | 680                                                 | 3,8                                   | 1,9                                 |                                      |                                                     |                                      |                                     |

- K<sub>m</sub> est la constante de Michaelis apparente et k<sub>3</sub> la constante de désacylation. L'indice ( )<sub>1</sub> est utilisé dans une zone de concentration où il n'y a pas d'activation par le substrat (10  $\mu$ M < (BAEE) < 20  $\mu$ M et 1  $\mu$ M < TAME < 20  $\mu$ M).

L'indice ( )<sub>2</sub> est utilisé pour des concentrations supérieures à 5 mM pour le BAEE et 3 mM pour le TAME où l'on voit une activation par le substrat. K<sub>m</sub> = K<sub>s</sub> est la constante de Michaelis vraie et k<sub>2</sub> la constante d'acylation pour le BAA (0,1 mM < BAA < 20 mM) et pour le TAA (0,4 mM < TAA < 12,5 mM).

\* Ces valeurs ont été obtenues dans les conditions suivantes : pH = 8,3 et 25°, CaCl<sub>2</sub> 2 mM et ont été corrigées de l'influence du calcium (F. Seydoux).

\*\* Valeurs déterminées à pH 7,5 par J.J. Béchet.

- Les constantes cinétiques portées dans ce tableau sont des constantes apparentes.



# Résultats.

=====

- Avec les esters spécifiques, l'activité de la N ε acétyltrypsine a été étudiée de pH 6 à pH 9,2 à trois forces ioniques différentes (0,01 - 0,1 - 1) dans les conditions suivantes :  $(e) = 2,5 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ ,  $(s) = 10^{-3} \text{ M}$ ,  $T = 25^\circ$ . Pour le BAEE et le TAME l'examen des courbes montre que :

a) à un même pH la vitesse de la réaction reste identique quelle que soit la force ionique du milieu (Figure 9),

b) le  $pK$  apparent de l'imidazole du centre actif ne varie pas lorsque la concentration saline varie alors qu'avec la trypsine native ce paramètre varie considérablement (Figure 10).

- Avec l'ATEE, substrat non spécifique, on note une variation de la vitesse d'hydrolyse du substrat en fonction de la force ionique (Figure 11). Si l'on porte  $pK = f(\sqrt{\mu})$  pour ce substrat on note une différence sensible entre la trypsine native et la trypsine acétylée (Figure 12). Le tableau suivant résume ces résultats.

|     | B A E E             |                     | T A M E             |                     | A T E E             |                     |
|-----|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|     | $pK''_b$            |                     | $pK''_b$            |                     | $pK_b$              |                     |
|     | $\mu \rightarrow 0$ | $\mu \rightarrow 1$ | $\mu \rightarrow 0$ | $\mu \rightarrow 1$ | $\mu \rightarrow 0$ | $\mu \rightarrow 1$ |
| TAC | $7,0 \pm 0,1$       | $7 \pm 0,1$         | $7,7 \pm 0,1$       | $7,7 \pm 0,1$       | $7,6 \pm 0,1$       | $6,9 \pm 0,1$       |
| TN  | $5,5 \pm 0,1$       | $6,7 \pm 0,1$       | $6,5 \pm 0,1$       | $7,7 \pm 0,1$       | $6,2 \pm 0,1$       | $6,9 \pm 0,1$       |

(Béchet et coll., 1968).  $pK''_b$  et  $pK_b$  sont respectivement les valeurs des  $pK$  de l'histidine dans l'acylenzyme et dans l'enzyme libre (schéma cinétique 2b partie expérimentale).



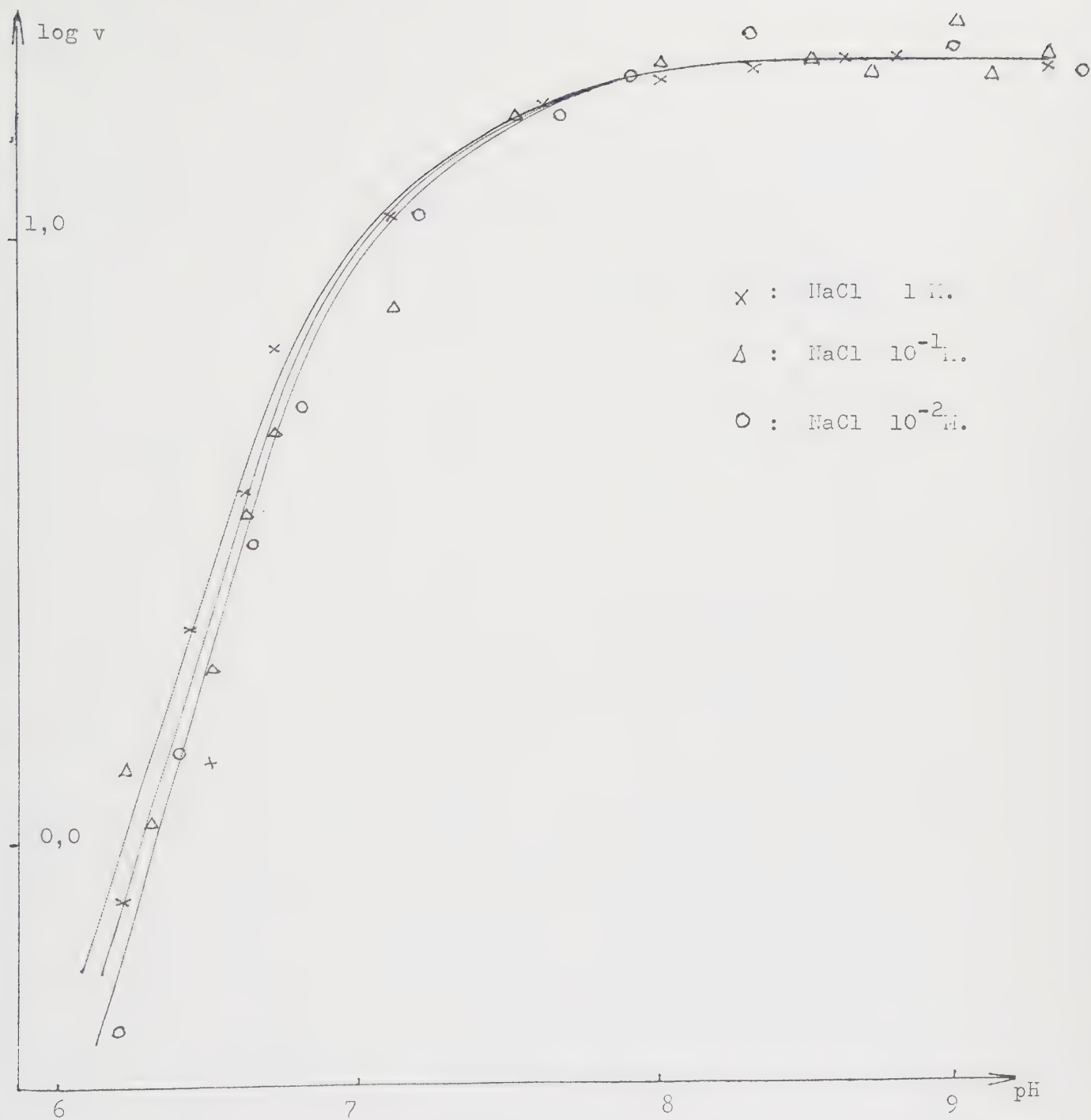


Figure : 9

Effet de la force ionique sur l'hydrolyse du  
BAEE par la trypsine acétylée.

( T°C.: 25° . - BAEE :  $10^{-3}$  M. - TAC :  $2,5 \cdot 10^{-8}$  M. )



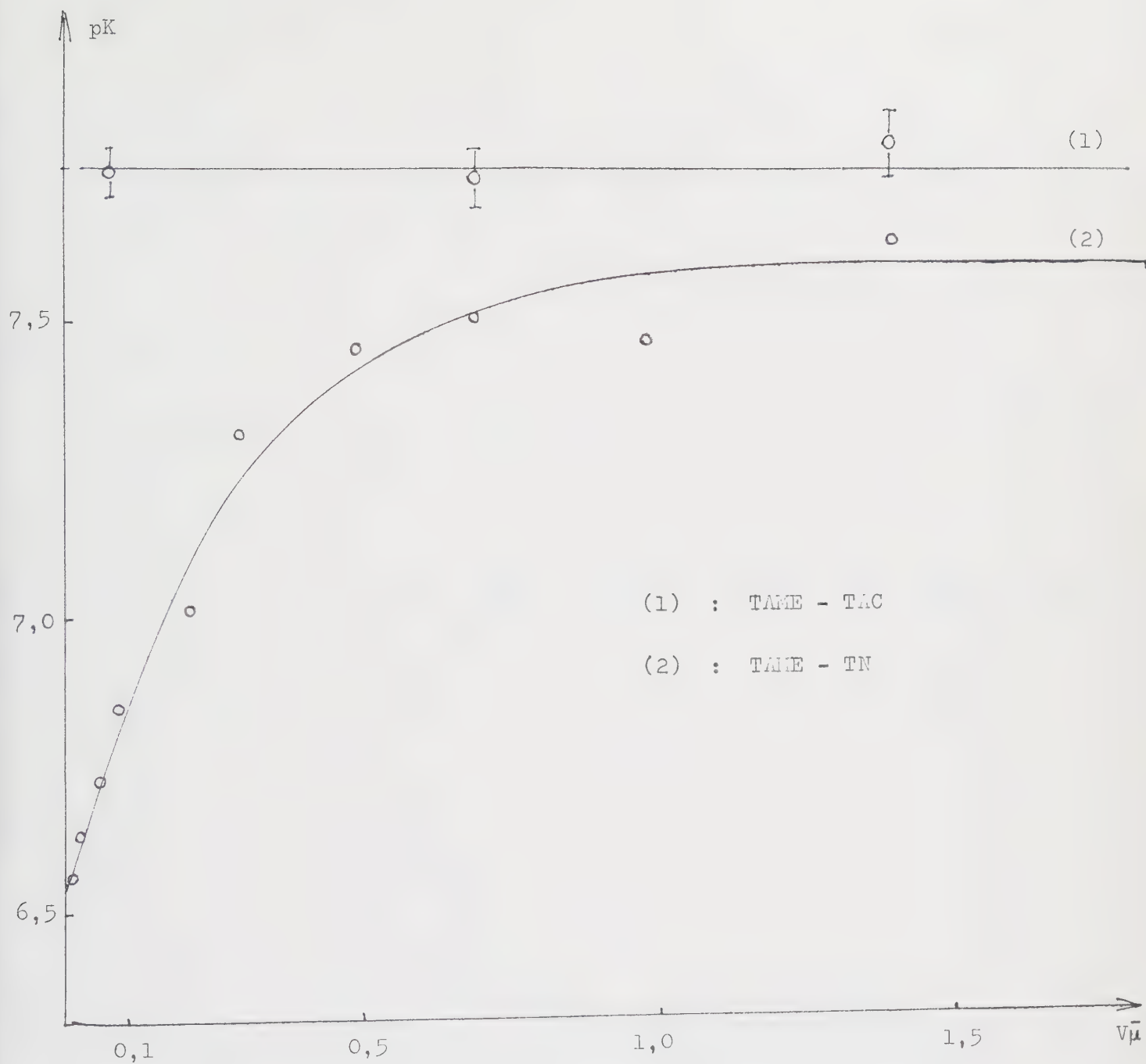


Figure : 10

Variation du pK de l'histidine du centre actif  
 en fonction de la force ionique pour l'hydrolyse du TAIE  
 par la TAC (1)  
 par la TN (2)



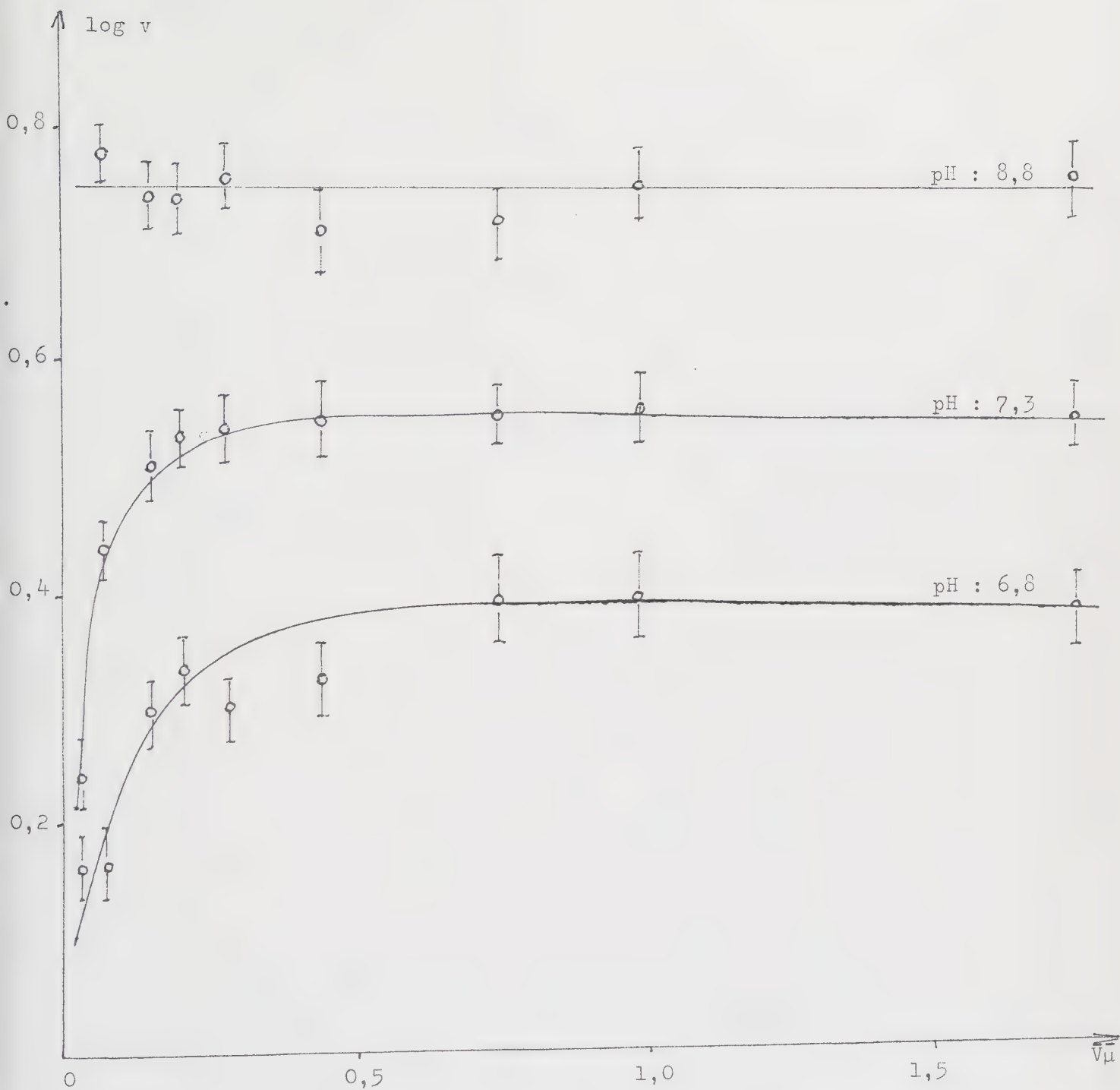


Figure : 11

Hydrolyse de l'ATEE par la TAC.

Représentation de  $\log v$  en fonction de  $V\mu$  à différents pH.

( T°C.: 25° . - (s) =  $5 \cdot 10^{-3}$  l. - (e) =  $10^{-7}$  M. )



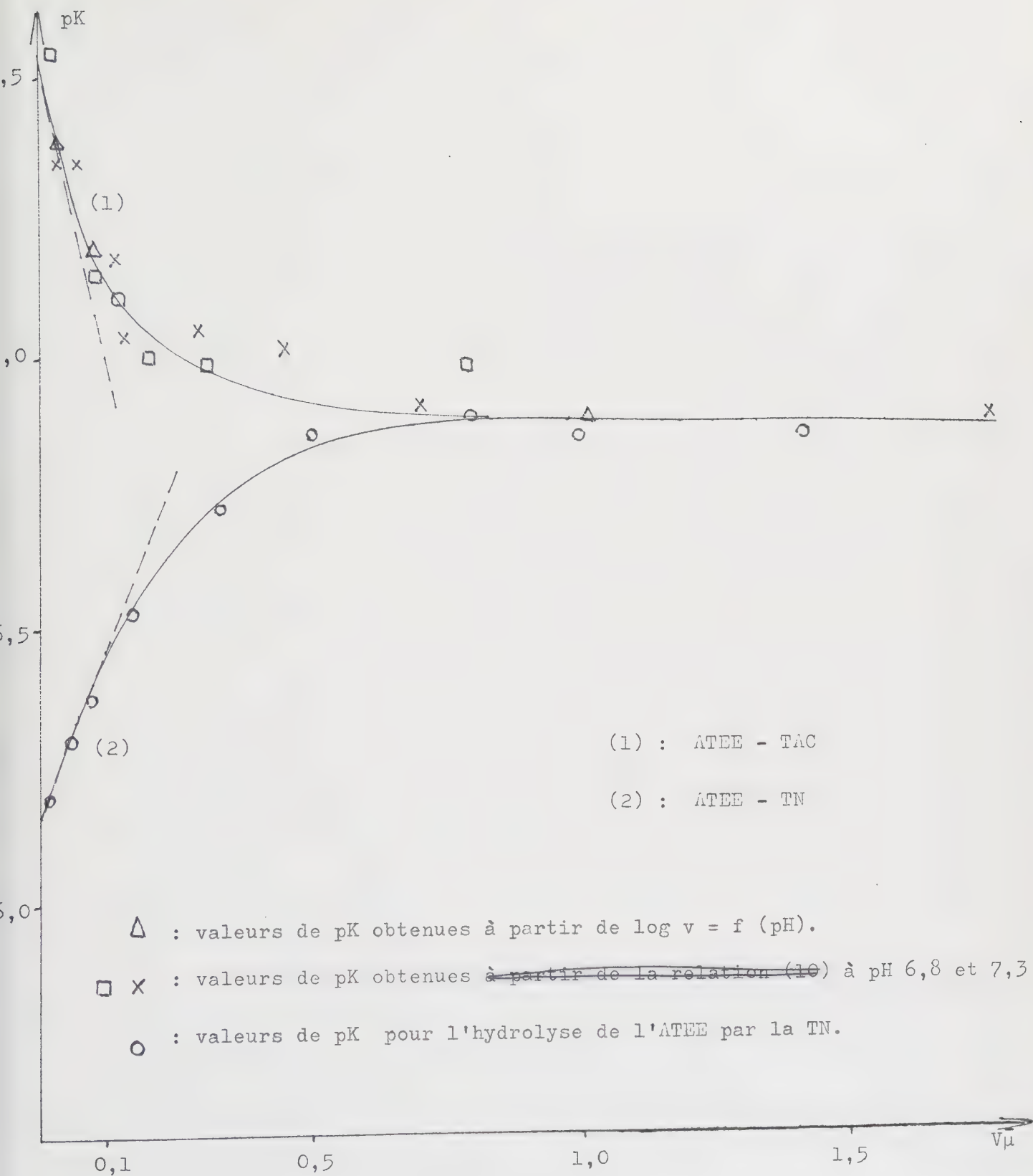


Figure : 12

Représentation de la variation du pK d'ionisation de l'histidine du centre actif, en fonction de  $V\bar{\mu}$  pour l'hydrolyse de l'ATEE par la TAC (1) et par la TN (2).



### Discussion.

Ces résultats peuvent être expliqués en appliquant, avec quelques réserves, la théorie de Debye-Huckel au centre actif de l'enzyme. Par hypothèse nous supposons que cette partie privilégiée de la protéine se comporte comme une molécule chargée. Nous ne développerons pas ici les raisonnements qui ont permis à Béchet et coll. (1968) et Béchet (1968) d'étudier théoriquement le problème et de montrer que la seule explication possible résidait en une modification de l'environnement électrostatique au site actif de l'enzyme. En effet, d'une part l'ionisation du groupement imidazole ne faisant pas apparaître de charge nouvelle n'est pas sensible à la force ionique, d'autre part un effet de charge globale de la protéine ne peut traduire le phénomène observé : la valeur de  $pK_b$  ne variant pas, à une force ionique donnée, avec le pH donc avec la charge de l'enzyme, dans le cas de la trypsine.

Avec la trypsine native et ses substrats esters spécifiques, le BAEE et le TAME, le  $pK$  d'ionisation de l'histidine est sensible à la force ionique, tandis qu'avec la N $\epsilon$  acétyltrypsine et les mêmes substrats, le  $pK$  demeure constant. On peut donc penser que deux de ces charges positives entrent en interaction avec l'histidine du centre actif de la trypsine native. Béchet (1968) évalue l'énergie de répulsion électrostatique ( $\Delta G_e$ ) entre ces charges et l'histidine respectivement à  $1.600 \pm 100$  calories et  $2.000 \pm 100$  calories pour le TAME et le BAEE. La distance approximative entre ces charges et la charge de l'histidine serait de l'ordre de 9 Å.

D'autre part, avec l'ATEE (substrat spécifique ne portant pas de chaîne latérale chargée positivement), on note une diminution du  $pK$  de l'histidine en fonction de  $\sqrt{\mu}$ . Il est logique de penser qu'en présence de ce substrat non chargé le carboxyle de fixation reste libre et d'expliquer ainsi l'effet attractif qui se manifeste alors entre l'histidine et ce groupe dans la zone où l'azote de l'imidazole est encore chargé. En faisant les mêmes hypothèses que Béchet, on peut évaluer approximativement l'énergie d'attraction entre les deux charges de signe contraire en utilisant la relation :

$$\Delta G_e = 2,3 RT (pK_{b1} - pK_{b2})$$



avec R constante des gaz parfaits, T température absolue,  $pK_{b1}$  le pK d'ionisation de l'imidazole dans le complexe N ε acétyltrypsine-ATEE à  $\mu > 1$  ( $6,9 \pm 1$ ),  $pK_{b2}$  le même pK d'ionisation à  $\mu \rightarrow 0$  ( $7,6 \pm 0,1$ ), on obtient alors  $\Delta G_e = -960 \pm 150$  calories. Il est enfin possible d'évaluer, là encore, la distance approximative d'approche entre les deux groupes en interaction par la relation suivante (Webb, 1963) :

$$\Delta G_e = \frac{Z_1 Z_2 e^2}{d.D} \text{ Kcal/mole,}$$

où e est l'énergie d'activation corrigée d'un facteur ( $r = 0,92$ ) soit  $e^2 = 305$ ,  $Z_1$  et  $Z_2$  respectivement la charge du carboxyle et la charge de l'histidine, D la constante diélectrique locale que l'on admet égale à ( $6 \text{ d} - 7$ ) : approximation valable pour des distances comprises entre  $3 \text{ \AA}$  et  $10 \text{ \AA}$ , d est la distance cherchée. Nous obtenons alors  $d = 7 \pm 1 \text{ \AA}$ .

L'interprétation des résultats obtenus avec l'ATEE appelle quelques réserves. En effet la signification des paramètres cinétiques ainsi obtenus n'est pas la même qu'avec un substrat spécifique comme le BAEE ou le TAME (voir partie cinétique). Il est possible que ce que l'on observe ici ne soit que la variation du pK de l'histidine dans l'enzyme libre et non sa variation dans l'enzyme acylé sur la sérine, la vitesse d'acylation devenant limitante. Des expériences supplémentaires devront être effectuées pour vérifier ces résultats.

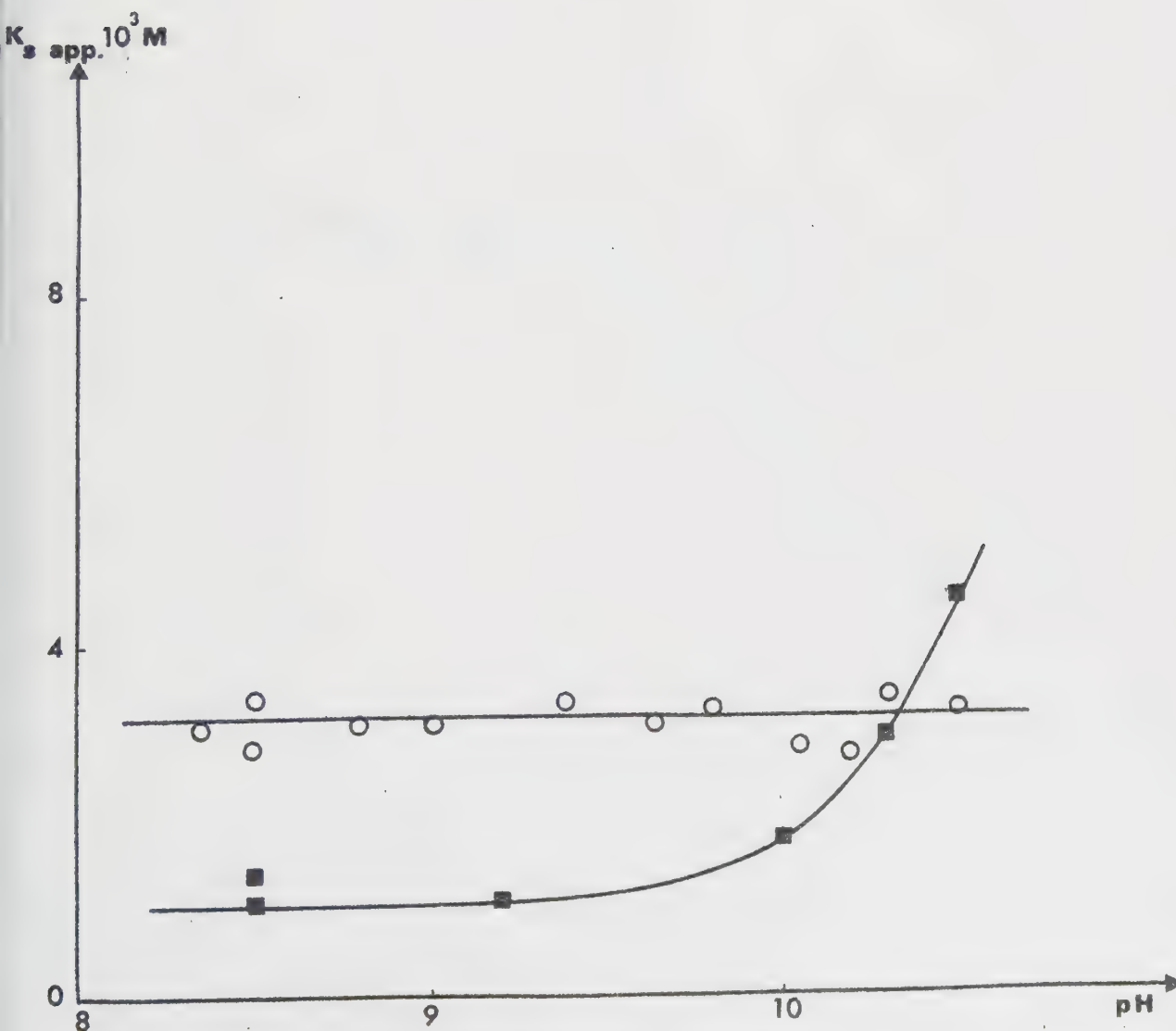
3°) Comportement de la N ε acétyltrypsine aux pH alcalins :  $\mu = 0,1$  et  $25^\circ$ , au cours de l'hydrolyse d'une amide spécifique, le EAA.

Nous avons utilisé une amide comme substrat, malgré les difficultés techniques de mesure des vitesses d'hydrolyse parce que nous voulions mesurer les constantes d'acylation et les constantes d'affinité, paramètres difficilement accessibles par l'étude cinétique des esters.

Les Figures 13 et 14 (TN et N ε acétyltrypsine -  $\log k_{2 \text{ app}}^f(\text{pH})$  et  $K_{s \text{ app}}^f(\text{pH})$ ) nous montrent que pour la trypsine native  $K_{s \text{ app}}^f$  est constant en fonction du pH jusqu'à pH 10,5, alors que  $k_{2 \text{ app}}^f$  varie avec un pK de 9,9-10,1.

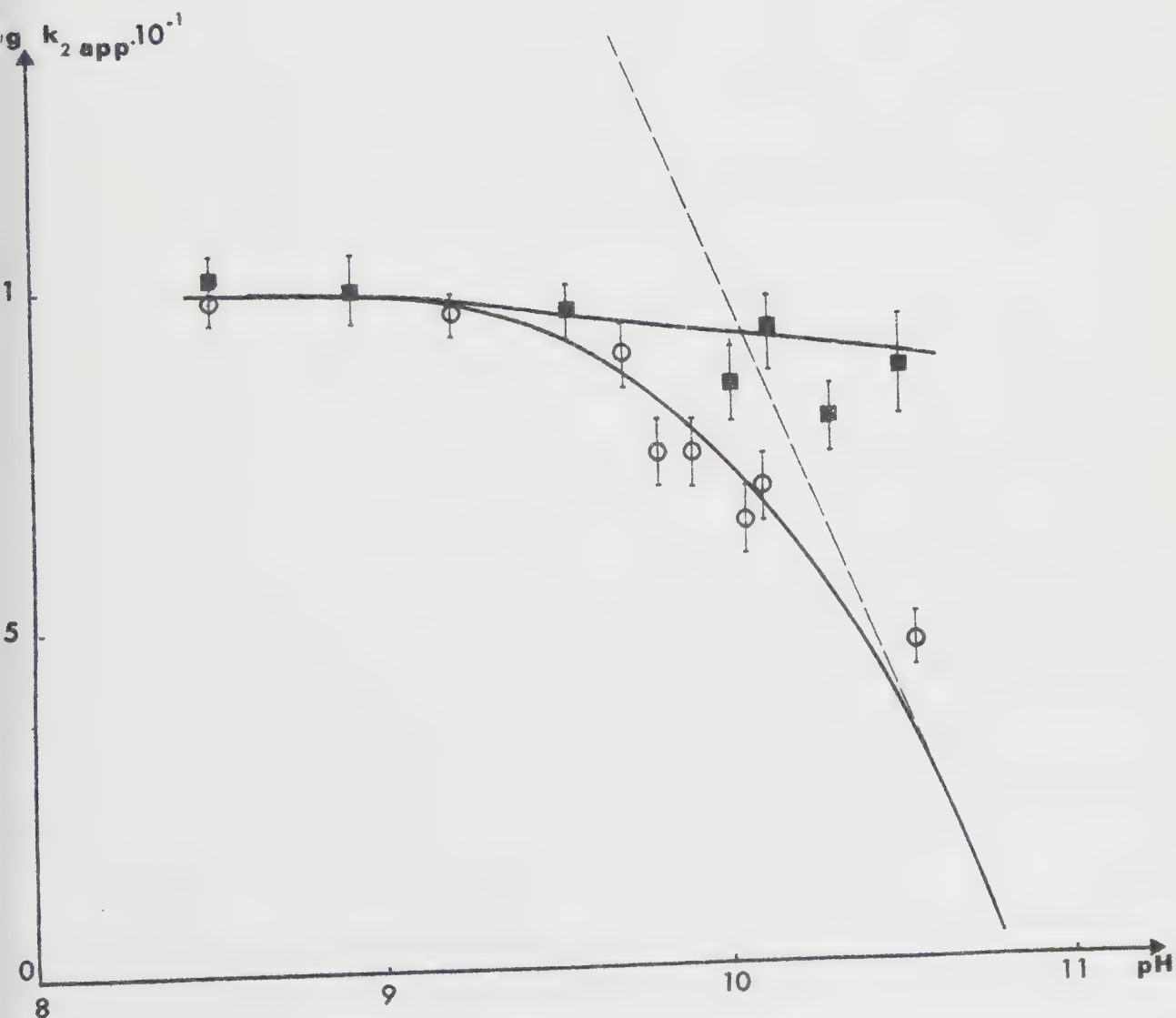


Figure 13 :      Variation de la constante de Michaelis apparente  
de la benzoyl L arginine amide en fonction de pH pour  
la trypsine native et pour la N ε acétyltrypsine à 25°.  
 Les concentrations de substrat varient de 0,5 mM à  
 15 mM. Les concentrations d'enzyme varient suivant le  
 pH de 20 µg/ml à 50 µg/ml. Tampon Tris HCl 0,02 M.  
 NaCl 0,1 M et tampon carbonate NaOH 0,02 M NaCl 0,1 M  
 ○ Trypsine native      ■ N ε acétyltrypsine.





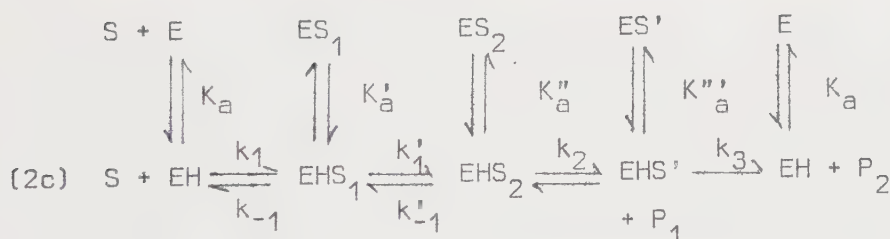
**Figure 14** - Variation du logarithme de la constante d'acylation apperente ( $k_2 \text{ app}$ ) en fonction du pH pour l'hydrolyse de la benzoyl L. arginine amide pour la trypsine native et la N  $\epsilon$  acétyltrypsine. Les conditions sont les suivantes : 25°, tampon Tris HCl 0,02 M NaCl 0,1 M et tampon carbonate NaOH 0,02 M NaCl 0,1 M.  $\circ$  Trypsine native  $\blacksquare$  N  $\epsilon$  acétyltrypsine. Les barres d'erreur sont évaluées pour des erreurs comprises entre 5 % et 10 %.





En revanche l'étude cinétique de la N  $\epsilon$  acétyltrypsine, exactement dans les mêmes conditions, montre que  $K_{s \text{ app}}$  varie avec un pK de 10 alors que  $k_2 \text{ app}$  reste pratiquement constant ( $k_2 \text{ app} = 1,09 \text{ sec}^{-1}$  à pH 8,5 et  $0,89 \text{ sec}^{-1}$  à pH 10,5). Cette contradiction se manifeste aussi lors de l'étude des constantes d'inhibition  $K_i$  pour un certain nombre d'analogues de substrats spécifiques affectés par l'ionisation de ce groupe de pK 10 (D'Albis et coll., 1968).

L'ensemble de ces résultats semble indiquer que la constante d'acylation obtenue expérimentalement est une constante complexe qui reflète vraisemblablement plusieurs étapes. Un certain nombre de résultats obtenus par Johannin et coll. (1966) et Seydoux (1966) vont d'ailleurs dans ce sens. Pour comprendre le comportement cinétique de la trypsine, et la dépendance des paramètres cinétiques vis-à-vis du pH, on peut faire intervenir un deuxième complexe intermédiaire consécutif au complexe de Michaelis et précédant la formation de l'acylenzyme. Le schéma réactionnel en fonction du pH a déjà été présenté auparavant (schéma cinétique 2c).



La signification des différents paramètres a déjà été précisée plus haut. La résolution de ce système dans les conditions de pH optimum avec l'amide où l'acylation est limitante ( $k_3 \gg k_2$ ), nous permet d'évaluer la constante de vitesse mesurée expérimentalement ainsi que la constante d'affinité en fonction des différents paramètres du système (voir partie cinétique).

Si l'on admet que la constante d'équilibre de transconformation est grande (ce qui n'est pas prouvé jusqu'à maintenant), on peut négliger  $k'_{-1}$  devant  $k'_1$  dans les expressions précédentes. Toutefois, même au pH optimum les constantes  $k'_1$  et  $k_2$  peuvent être d'un ordre de grandeur assez voisin. En effet, pour l'hydrolyse tryptique de la benzoyl L arginine para nitro anilide par la trypsine, Johannin



et coll. (1966) pensent que  $k_2 = 0,34 \text{ sec}^{-1}$  à pH 8 et à  $21^\circ$ . De leurs résultats on peut évaluer que  $k'_1$  a une valeur de l'ordre de  $3 \text{ sec}^{-1}$  environ. Il n'est donc pas exclu que  $k'_1$  devienne limitant à d'autres valeurs du pH.

Les variations des diverses constantes en fonction du pH se traduisent par les expressions suivantes (Krupka et coll., 1960) :

$$k'_1 (\text{pH}) = k'_1 / (1 + K'_a / H^+)$$

$$k_2 (\text{pH}) = k_2 / (1 + K''_a / H^+)$$

$$K_s (\text{pH}) = K_s (1 + K_a / H^+) / (1 + K'_a / H^+).$$

Ces expressions permettent de calculer les variations des paramètres cinétiques expérimentaux (relations 5 et 6, études cinétiques).

On admet d'abord que, pour la TN, le pK d'ionisation du groupe est déplacé dans le complexe de transconformation :  $K''_a$  devient petit devant  $K_a$  et  $K'_a$ . On peut poser que  $K_a = K'_a$  si l'on admet que la formation du complexe de Michaelis ne provoque pas de remaniements profonds dans la conformation de l'enzyme, donc ne modifie pas le pK du groupe impliqué. Les expressions (5) et (6) deviennent alors :

$$k_{2 \text{ app}} (\text{pH}) = \frac{k'_1 k_2}{k'_1 + k_2} \left( \frac{1}{1 / (K_a / H^+)} \right)$$

$$K_{s \text{ app}} (\text{pH}) = K_s \frac{k_2 (1 + K_a / H^+)}{k'_1 + k_2 (1 + K'_a / H^+)}$$

Si, comme on le suppose, aux pH alcalins  $k'_1$  devient limitant, on pourra dire que  $k'_1 \ll k_2 (1 + K'_a / H^+)$  et l'on aura :

$$K_{s \text{ app}} (\text{pH}) = K_s$$



Ces expressions reflètent une dépendance de  $k_2$  vis-à-vis d'un groupe ionisable de l'enzyme libre, cependant que  $K_s$  app reste indépendant : ce qui explique nos résultats cinétiques avec la trypsine native.

Si, par contre, on admet que, pour la trypsine acétylée, à la fois  $K'_a$  et  $K''_a$  se trouvent déplacés par rapport à  $K_a$ , dans nos conditions expérimentales les expressions  $K'_a / H^+$  et  $K''_a / H^+$  deviennent négligeables. Les expressions (5) et (6) deviennent :

$$k_{2 \text{ app}} (\text{pH}) = \frac{k'_1 k_2}{k'_1 + k_2}$$

et

$$K_{s \text{ app}} (\text{pH}) = K_s \frac{k_2}{k'_1 + k_2} (1 + K_a / H^+)$$

montrant que  $k_2$  est indépendant du pH et que  $K_s$  varie suivant l'ionisation d'un groupe de l'enzyme libre.

Les hypothèses exposées ci-dessus suggérant un comportement différent du groupe qui contrôle l'activité de l'enzyme aux pH alcalins dans les complexes intermédiaires suivant qu'il s'agit de la TN ou de la TAC ne sont pas fortuites ; les interactions électrostatiques au site actif sont très différentes dans les deux formes d'enzyme comme nous l'avons vu plus haut.

L'hypothèse proposée qui fait intervenir un complexe de transconformation consécutif au complexe de Michaelis et précédant l'étape d'acylation a le mérite d'expliquer le comportement différent des constantes catalytiques en fonction du pH dans la trypsine native avec des substrats différents et des inhibiteurs compétitifs. Elle fait en outre intervenir des interactions électrostatiques au centre actif de l'enzyme natif imputables à la présence de deux groupes lysines. Tout ceci demande évidemment une confirmation expérimentale plus approfondie.



## CONCLUSION.

Nous avons, dans ce chapitre, comparé la N  $\epsilon$  acétyltrypsine en analysant le comportement de l'enzyme modifié sous l'angle de sa stabilité dans différents milieux, de l'accessibilité de ses chromophores tryptophanes et tyrosines et de son comportement cinétique. Ces données montrent dans quelle mesure nous pouvons étendre à la trypsine les résultats que nous obtiendrons par la suite avec la N  $\epsilon$  acétyltrypsine.

La trypsine acétylée sur les groupes  $\epsilon$  aminés des lysines est beaucoup plus stable que la trypsine non substituée. Ceci est extrêmement intéressant car nous pouvons ainsi espérer modifier chimiquement l'enzyme acétylé dans des conditions que l'enzyme natif n'aurait pu supporter. Cependant la différence de charge globale de l'enzyme acétylé rend celui-ci instable aux pH inférieurs à 6. Nous notons qu'il est possible de titrer réversiblement jusqu'à pH 11,3, pour les deux formes d'enzyme, 4 à 5 résidus phénoliques de tyrosines. Les comparaisons ne peuvent pas être conduites plus avant car on ne possède que peu de résultats valables sur le comportement de la trypsine native dans ces conditions, l'instabilité de l'enzyme natif ne favorisant pas les études systématiques.

Le comportement cinétique des deux formes de l'enzyme est le même au pH optimum. Par l'étude de l'effet de la force ionique nous avons pu montrer que deux résidus  $\epsilon$  aminés de lysine déplaçaient le pK de l'histidine du site actif. La variation des paramètres cinétiques avec les substrats amides aux pH alcalins est différente pour la trypsine native et la trypsine acétylée. Nous avons expliqué ces différences en montrant que les interactions électrostatiques devaient être différentes au site actif de la trypsine acétylée du fait de la substitution des deux lysines mises en évidence à la suite de l'étude de l'effet de la force ionique.

Nous pensons qu'il est possible d'étudier les formes chimiquement modifiées de la N  $\epsilon$  acétyltrypsine et d'extrapoler les résultats ainsi obtenus au comportement de la trypsine native.



## II - Résultats des études de modifications chimiques de la N $\epsilon$ acétyltrypsine.

### A - Nature du groupe responsable de la variation des paramètres cinétiques aux pH alcalins.

Nous avons exposé, dans l'introduction, le but principal de notre étude : la recherche, à l'aide de modifications chimiques, de la nature du groupe contrôlant l'activité de la trypsine aux pH alcalins. Nous avons été conduits à utiliser, pour ce faire, une forme de trypsine plus stable que la trypsine native, la N  $\epsilon$  acétyltrypsine. Nous nous sommes attachés à préciser dans quelle mesure nous pouvions assimiler les résultats que l'on obtient à partir de cette forme d'enzyme avec ceux que l'on possède pour l'enzyme natif : étape indispensable de notre recherche. Nous avons vu qu'il était permis d'assimiler la trypsine native et la trypsine acétylée tout en gardant présent à l'esprit que la charge globale de la protéine acétylée sur les lysines était modifiée, et qu'apparemment deux de ces résidus se trouvent non loin du site actif en interaction avec l'histidine 46. Ce résidu semble être aussi en interaction avec le carboxyle de fixation des substrats spécifiques comme on peut le penser après les études de l'effet de la force ionique en prenant l'ATEE comme substrat.

Rappelons en quels termes se posait alors notre problème. Le pK 10 mesuré pour la trypsine était-il dû à l'ionisation d'une des fonctions  $\epsilon$  NH<sub>2</sub> des résidus lysines, ou à celle d'un résidu phénolique des tyrosines, ou, comme dans le cas de la chymotrypsine pouvait-on penser que l' $\alpha$  NH<sub>2</sub> de l'isoleucine N terminale avait ce rôle ? L'étude que nous avons effectuée avec la N  $\epsilon$  acétyltrypsine nous a clairement montré que les  $\epsilon$  aminés des lysines n'étaient pas responsables du changement d'activité aux pH alcalins : le comportement de la trypsine acétylée étant le même que celui de la trypsine native à quelques détails près (voir le chapitre précédent l'étude aux pH alcalins avec le BAA).

Dans ce chapitre nous allons exposer les résultats obtenus en étudiant l'acétylation de l' $\alpha$  NH<sub>2</sub> de l'isoleucine N terminale et la méthylation des rési-



des phénoliques des tyrosines en vue de la détermination du groupe responsable du pK 10.

1°) Est-ce l' $\alpha$  NH<sub>2</sub> de l'isoleucine N terminale ?

Pour quelles raisons avons-nous été amenés à nous demander si ce résidu pouvait être responsable de la variation de l'activité aux pH alcalins ? Dans le cas de la chymotrypsine, protéase présentant une activité amidasique et estérasique vraisemblablement contrôlée par des étapes de réaction analogues (Bender et coll., 1965), un groupe de pK apparent de 9 (Kaufman et coll., 1959 - Bender et coll., 1962 - Erlanger et coll., 1963) et de pK vrai aux environs de 8 (Karibian et coll., 1968) intervient sous sa forme protonée ; on a pu montrer qu'il s'agissait du groupe  $\alpha$  aminé de l'isoleucine N terminale de la chaîne (Oppenheimer et coll., 1966). Son ionisation entraîne un changement de conformation de la chymotrypsine et de ce fait, une décroissance de l'affinité (Oppenheimer et coll., 1966 - Karibian et coll., 1968). Comme par ailleurs, certains auteurs voient de grandes analogies entre la chymotrypsine et la trypsine pour la structure primaire (Walsh et coll., 1954) et par voie de conséquence pour la structure tridimensionnelle (Sigler et coll., 1968), nous avons pensé qu'il était nécessaire de voir si l' $\alpha$  NH<sub>2</sub> n'avait pas le même rôle dans les deux enzymes. Scrimger et coll. (1967) avaient observé de leur côté, que la désamination de la trypsine entraînait une perte de l'activité vis-à-vis de substrats spécifiques, ce qui pouvait étayer cette hypothèse.

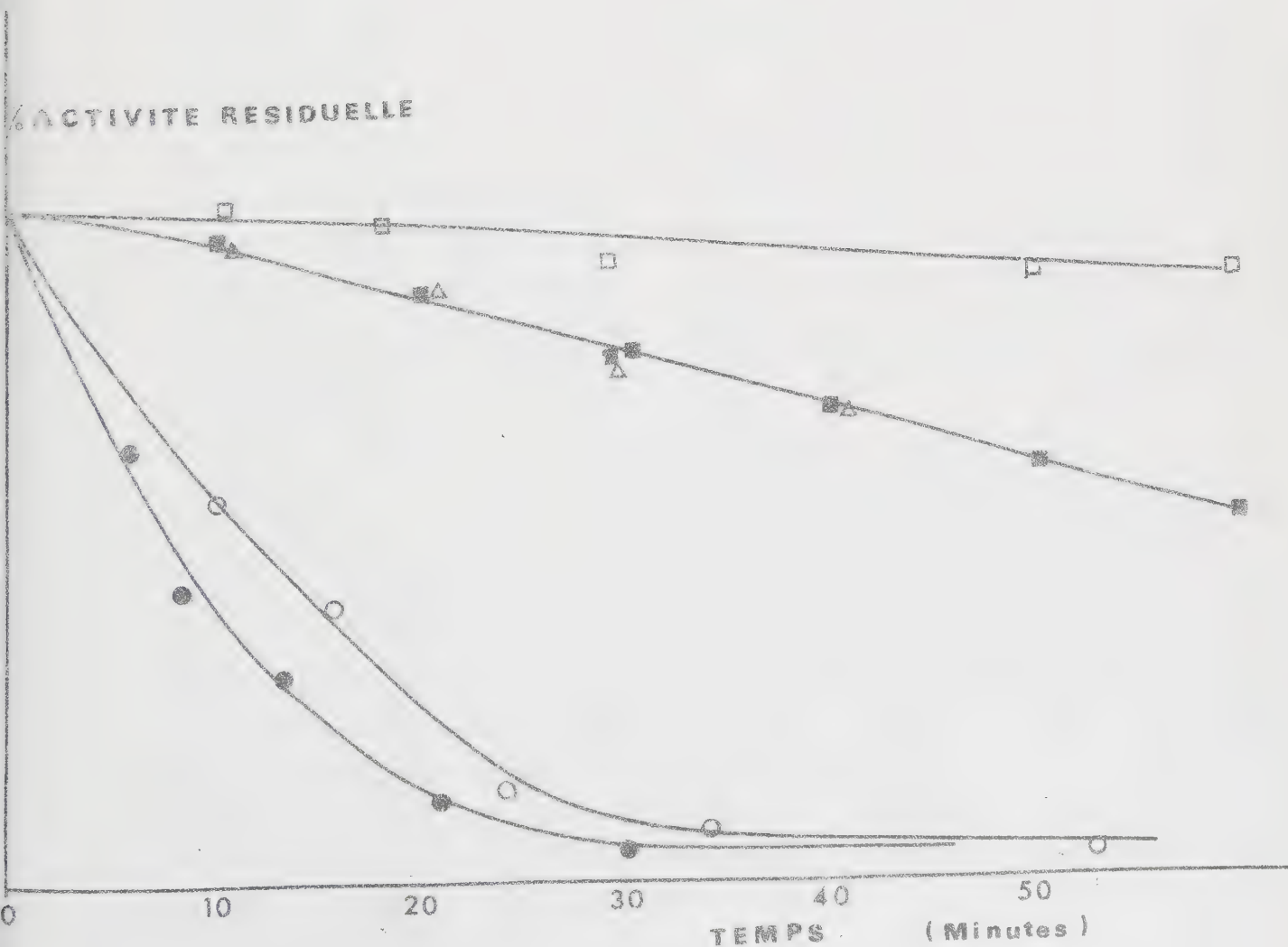
Le résidu  $\alpha$  aminé de l'isoleucine N terminale est difficilement accessible aux réactifs des groupes aminés (Labouesse et coll., 1966). Nous avons donc acétylé ce groupe dans des conditions expérimentales qui le rendent plus réactif. La réaction s'effectue avec de l'anhydride acétique dans les conditions déjà décrites. La Figure 15 présente les variations d'activité vis-à-vis du TAME de la N  $\epsilon$  acétyltrypsine pendant son acétylation à pH 6,8 par l'anhydride acétique dans diverses conditions. Il est net que la présence d'urée dans le milieu réactionnel accélère la perte d'activité de l'enzyme. Le titrage du site actif de la protéine ainsi modifiée montre en fin de réaction (50 minutes) que celui-ci est complètement détruit. Par contre une solution témoin de N  $\epsilon$  acétyltrypsine en urée perd peu de son activité et son site actif reste pratiquement intact.



Figure 15 - Variation en fonction du temps de l'activité de la N  $\epsilon$  acétyltrypsine pendant son acétylation par l'anhydride acétique en présence d'urée.

Les expériences sont faites dans les conditions suivantes : ● pH 6,8 et 20°. 4  $\mu$ M de N  $\epsilon$  acétyltrypsine dans une solution d'urée 4 M. 1% en volume d'anhydride acétique (final); ○ mêmes conditions dans l'urée 2 M; □ N  $\epsilon$  acétyltrypsine 4  $\mu$ M en urée 4 M 20° et pH 6,8 sans anhydride acétique; ■ N  $\epsilon$  acétyltrypsine 4  $\mu$ M pH 6,8 - 20° sans urée avec anhydride acétique; △ N  $\epsilon$  acétyltrypsine 4  $\mu$ M, pH 6,8, urée 2 M,, 20° , acide acétique glacial 2% en volume final.

Les activités résiduelles sont déterminées vis à vis du tosyl L arginine méthylester à pH 8,35 et 25° en NaCl 0,1 M avec des concentrations d'enzyme de 0,8  $\mu$ g par ml.





Le titrage du groupe  $\alpha$  aminé de l'enzyme ainsi traité par réaction avec le FDNB montre que le résidu d'isoleucine est totalement acétylé, la protéine ayant perdu alors plus de 95 % de son activité vis-à-vis des substrats esters spécifiques au bout de 30 minutes environ d'acétylation en urée. On a tracé sur la Figure 15 la courbe représentant l'acétylation de l' $\alpha$   $\text{NH}_2$  de la trypsine acétylée ; en absence d'urée la réaction est très lente.

Afin de s'assurer que seule la substitution de ce groupe est responsable de la disparition de l'activité, et que le traitement par l'urée et l'anhydride acétique ne provoque pas de dénaturation irréversible, nous avons tenté de rompre la liaison N-acétyl pour retrouver l'activité comme cela a été possible pour la chymotrypsine (Garel et Ghélis, communication personnelle). Sachant qu'en hydroxylamine 0,5 M ou M à pH 7,5 et en présence d'urée 2 M à la température ordinaire la trypsine acétylée est stable pendant plus de deux heures (voir le tableau 1), le lot de N $\epsilon$  acétyltrypsine acétylée sur l' $\alpha$   $\text{NH}_2$  a été soumis à ces conditions. En effet, l'hydroxylamine à concentration suffisamment élevée entraîne l'hydroxylaminolyse lente des liaisons amides (Jencks et coll., 1964). Mais le lot d'enzyme modifié a immédiatement précipité. Nous n'avons donc pas pu vérifier si l' $\alpha$   $\text{NH}_2$  était désacétylé et si l'activité pouvait être restaurée. Notons que, dans le cas de la chymotrypsine, la liaison N - O -  $\text{CH}_3$  n'est rompue qu'après traitement par l'hydroxylamine 4 M pendant plus d'une demi heure à 25° et pH 7,5 (Ghélis, communication personnelle). Il est donc possible que, dans notre cas, la désacétylation n'ait pas lieu.

Nous avons pu déceler, par ailleurs, un effet dénaturant sensible (environ 30 % de l'activité totale) de l'acide acétique dans nos conditions opératoires sur l'activité de l'enzyme vis-à-vis du BAEE. On peut donc penser qu'au cours de la réaction deux effets simultanés influent sur l'activité de l'enzyme : d'une part l'acétylation de l' $\alpha$   $\text{NH}_2$  et d'autre part une dénaturation due aux conditions opératoires. Il semble cependant, même en tenant compte de l'effet dénaturant du réactif allié à l'urée 2 M, que l'enzyme dont on supprime par acétylation la possibilité d'ionisation du groupe aminé de l'isoleucine terminale perde son activité à pH 8. Mais au contraire de la chymotrypsine (Ghélis et coll., 1967) cette diminution d'activité entraîne une destruction de son site actif. Etant donné les conditions particulières dans lesquelles cette substitution a lieu



(urée 2 M ou 4 M), et étant donné qu'il n'est apparemment pas possible de réactiver l'enzyme, ces expériences ne permettent pas de conclure définitivement que le groupe de pK 10 est l' $\alpha$  NH<sub>2</sub> de l'isoleucine N terminale. Remarquons cependant que ces résultats vont dans le même sens que ceux de Scrimger et coll. (1967).

Nous avons essayé plusieurs autres substances susceptibles de provoquer une modification de conformation suffisante pour rendre l' $\alpha$  NH<sub>2</sub> plus accessible à l'anhydride acétique tout en gardant la conformation générale de la protéine, ce que ne fait certainement pas l'urée. Nous avons essayé d'acétyler ce résidu toujours par le même réactif en présence de benzamidine 20 mM, ou de benzoyl L arginine 10 mM ou de diméthyle sulfoxyde à 20 % et 40 % (v/v). Le seul effet que nous ayons pu observer est une augmentation de la vitesse de réaction des tyrosines en présence de 40 % de diméthyle sulfoxyde. L'effet de protection de l' $\alpha$  NH<sub>2</sub> dans la trypsine existe toujours. Ce n'est pas un hasard si la présence de benzamidine en concentration saturante ne permet pas de rendre ce groupe plus accessible. En effet d'Albis et coll. (1968) montrent qu'en présence d'inhibiteurs compétitifs la structure de la protéine est plus compacte que lorsque l'enzyme est libre. Il est donc logique, à la lumière de ces résultats, de ne pas substituer plus rapidement le résidu N terminal. Le blocage par acétylation n'est donc pas le moyen qu'il faut utiliser pour savoir si ce groupe est vraiment responsable de la variation d'activité aux pH alcalins. Nos résultats sont discutables.

## 2°) Est-ce l'un des résidus phénoliques des tyrosines ?

Dans le cas de la chymotrypsine, s'il a été relativement facile de montrer que les deux tyrosines libres de l'enzyme n'ont pas de rôle important ni pour le contrôle de conformation ni pour l'activité (Karibian et coll., 1968), dans le cas de la trypsine cette discrimination est plus difficile, car aussi bien les tyrosines accessibles que le groupe critique pour l'activité en milieu alcalin s'ionisent aux environs de pH 10. Nous avons exposé précédemment ce que l'on sait de l'état des tyrosines de la N<sup>ε</sup> acétyltrypsine. Nous avons déjà discuté dans le premier chapitre ce que nous pouvions attendre de la méthylation



des groupes tyrosines par le sulfate de méthyle.

#### Partie chimique.

-----

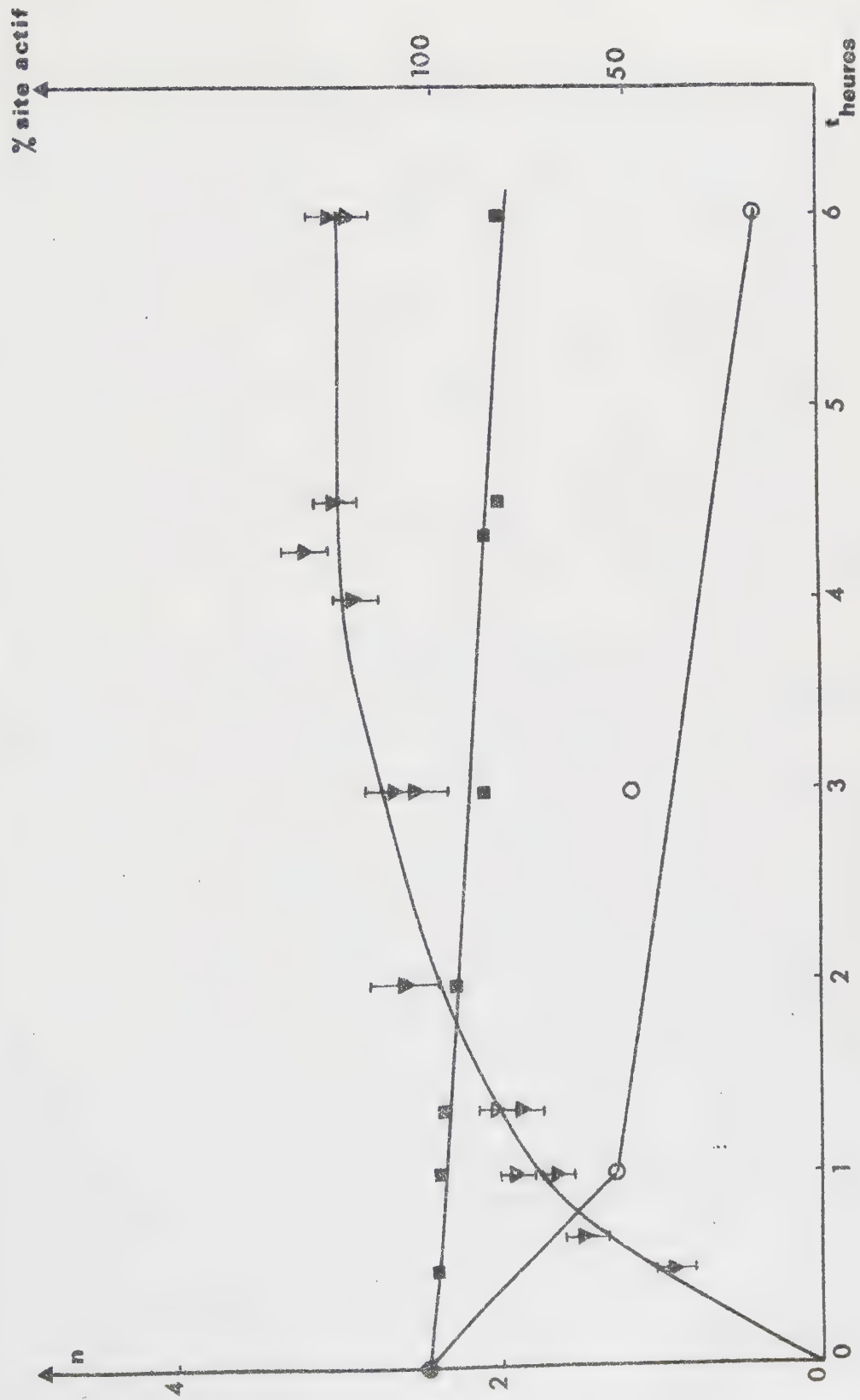
##### 1°) Nombre de tyrosines méthylées.

Il apparaît sur la Figure 16 que l'on peut méthyler trois résidus phénoliques par mole de trypsine acétylée à pH 10 dans nos conditions de réaction. Ce chiffre est atteint après 4 heures de substitution et ne semble pas varier ensuite. Que la réaction ait lieu avec ou sans benzamidine 20 mM, inhibiteur compétitif de l'enzyme, le nombre des résidus modifiés reste le même. Or si la méthylation est effectuée en absence de benzamidine, le titrage de site actif montre que celui-ci diminue considérablement en fonction du temps ce qui n'est pas le cas si l'on opère en présence de l'inhibiteur. Il faut donc supposer que la réaction de méthylation n'est pas spécifique des groupes phénoliques (ce que nous avons déjà discuté) et que la sérine ou l'un des azotes de l'histidine du site actif se trouve modifié. Ces groupes se trouvent être protégés par la présence de l'inhibiteur compétitif en concentration saturante ( $K_1$  de la benzamidine  $1,5 \cdot 10^{-4}$  M à pH 10,9 et  $4 \cdot 10^{-5}$  M à pH 10) (Mares-Guia et coll., 1965 - Béchet, 1968). D'Albis et coll. ont suggéré qu'en présence de butylamine (1964) et de benzamidine (1969), inhibiteurs compétitifs, une tyrosine de pK 10,3 est protégée de la protonation dans la trypsine native. Or aucune différence dans le nombre de tyrosines méthylées à pH 10 n'apparaît en présence de benzamidine. Il semble aussi que la vitesse de substitution du troisième résidu phénolique n'est pas altérée par la présence de l'inhibiteur. La vitesse de réaction avec le sulfate de méthyle des tyrosines ainsi modifiées n'est pas constante tout au long de la réaction. On peut en première approximation dire qu'un premier groupe de deux tyrosines réagit trois fois plus vite que la troisième tyrosine. Le rapport entre ces deux constantes de vitesse n'est pas considérable. Nous estimons cependant qu'il est possible d'isoler après une heure une forme de N ε acétyltrypsine méthylée sur deux tyrosines ( $N(O \text{ méthyl})_2 \epsilon$  acétyltrypsine) et après quatre heures une forme de N ε acétyltrypsine méthylée sur trois tyrosines ( $N(O \text{ méthyl})_3 \epsilon$  acétyltrypsine).



Figure 16 - Nombre de résidus tyrosines de la N-ε-acétyltyrosine redépassant avec le sulfate de méthyle en

fonction du temps. Les expériences sont faites dans les conditions suivantes : 2 à 4°, pH 10, N-ε-acétyl-trypsine 0,06 mM, sulfate de méthyle 2 % (v/v) final ▼ en présence de benzamidine 20 mM ; ▽ en absence de benzamidine. Les barres d'erreur sont évaluées pour des erreurs comprises entre 5 % et 10 %. Ordonnée de droite : pourcentage de site actif par rapport au site actif au temps zéro, déterminé par l'ester para-nitrophénylique de l'acide acétique à 400 nm à pH 8 et avec 150 µg d'enzyme par ml ; ■ méthylation en présence de benzamidine ; ○ méthylation en absence de benzamidine.





## 2°) Influence du pH sur la réaction de méthylation.

La Figure 17 montre que la vitesse de méthylation dépend assez sensiblement du pH. La troisième tyrosine modifiée après quatre heures de réaction à pH 10 n'est qu'à demi substituée pendant le même temps à pH 9,5. Ceci est parfaitement normal si l'on admet que la méthylation se fait sous la forme phénolate (Cram et coll., 1964). Réagissent donc le plus rapidement les groupes phénoliques de pK le plus bas. C'est le cas pour deux tyrosines qui sont substituées en une heure à pH 10 et en deux heures à pH 9,5. Une troisième tyrosine est méthylée plus lentement (4 heures à pH 10). Il n'est pas possible de modifier d'autres fonctions phénoliques à ces pH dans des temps de réaction raisonnables. Les tyrosines accessibles semblent donc présenter des pK différents, ce qui est en accord avec les résultats que nous avons discutés dans le chapitre précédent.

## 3°) Discussion - Trois points peuvent déjà être abordés :

a) Peut-on obtenir les constantes de vitesse de méthylation ? La réaction se fait avec un grand excès de diméthylsulfate (voir partie expérimentale), les tyrosines réagissent sous la forme phénolate, les constantes de vitesse devraient donc être globalement d'ordre un. Si l'on porte le logarithme de la différence entre le nombre total de tyrosines méthylées ( $Tr_{\infty}$ ) et le nombre de tyrosines méthylées au temps  $t$  ( $Tr$ ) en fonction du temps comme le montre la Figure 18 pour la réaction à pH 10, on peut déduire deux constantes de vitesse globale de pseudo ordre un. Un premier groupe de deux tyrosines semble réagir avec une constante de vitesse de l'ordre de  $5,5 \cdot 10^{-2} \text{ mn}^{-1}$  ; la troisième tyrosine est modifiée avec une constante de vitesse de l'ordre de  $1,6 \cdot 10^{-2} \text{ mn}^{-1}$ . La représentation que nous avons choisie montre que le mécanisme de la méthylation est bien apparemment d'ordre un. Le mécanisme de cette réaction et son ordre nous ont paru être des problèmes relativement secondaires pour notre étude, aussi nous sommes-nous contentés de relever ce fait sans l'étudier à fond. Nous pouvons cependant dire, comme nous l'avons fait précédemment, que les constantes de vitesse sont globalement dans le rapport 3/1.



Figure 17 :

Nombre de résidus tyrosines de la N -  $\epsilon$  acétyltrypsine réagissant avec le sulfate de méthyle en fonction du pH.

Les expériences sont faites dans les conditions suivantes : 2 à 4°,

N- $\epsilon$  acétyltrypsine 0,06 mM et sulfate de méthyle 2 % final (v/v) ; ● pH = 10 ;

○ pH = 9,5. Les barres d'erreur sont évaluées pour des erreurs comprises entre 5 et 10 % .

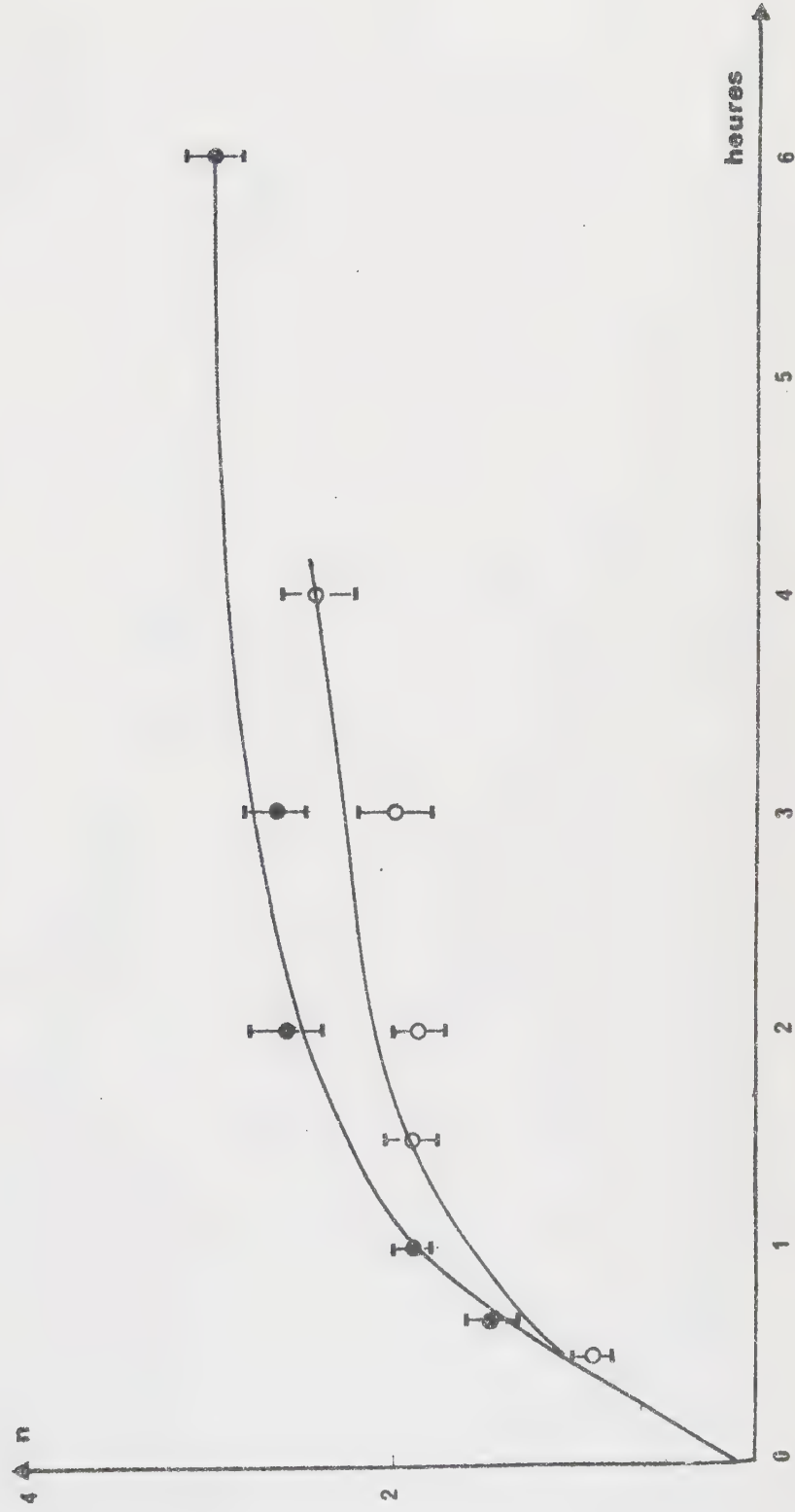
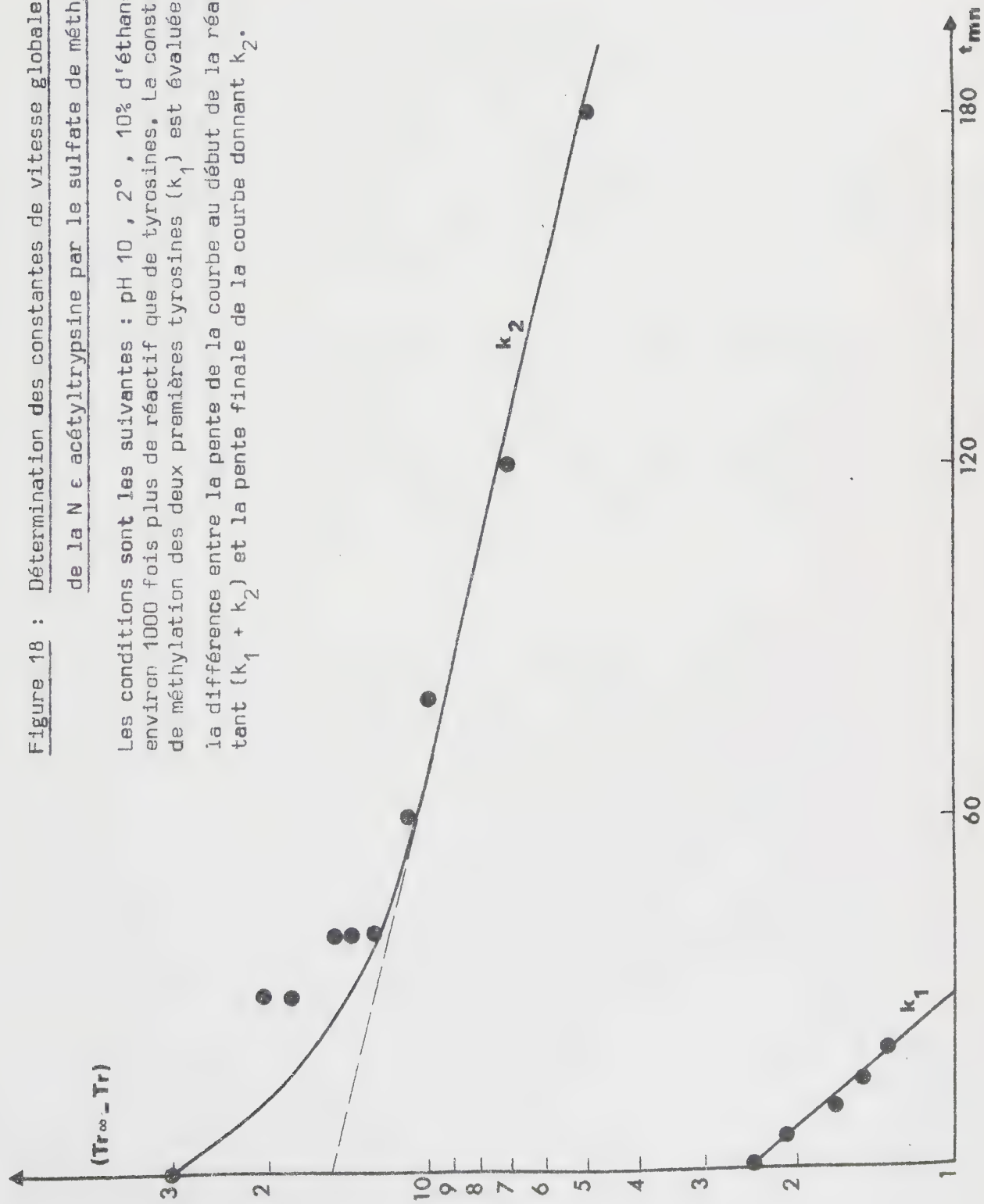




Figure 18 : Détermination des constantes de vitesse globale de méthylation de la N  $\epsilon$  acétyltrypsine par le sulfate de méthyle.

Les conditions sont les suivantes : pH 10 , 2° , 10% d'éthanol environ environ 1000 fois plus de réactif que de tyrosines. La constante apparente de méthylation des deux premières tyrosines ( $k_1$ ) est évaluée en reportant la différence entre la pente de la courbe au début de la réaction représentant ( $k_1 + k_2$ ) et la pente finale de la courbe donnant  $k_2$ .





b) Cette différence dans les valeurs des constantes de vitesse est-elle suffisante pour que l'on puisse penser isoler un lot de N  $\epsilon$  acétyltrypsine méthylée sur deux tyrosines bien définies ? Il est bien évident que la troisième tyrosine peut avoir réagi quelque peu après une heure de réaction. Mais nous pensons que ceci ne peut profondément perturber nos conclusions. Nous verrons plus loin que, du point de vue cinétique, il y a quelques différences entre N  $\epsilon$  acétyltrypsine méthylée sur deux et sur trois résidus tyrosines (N (O méthyl)<sub>2</sub>  $\epsilon$  acétyltrypsine et N(Ométhyl)<sub>3</sub>  $\epsilon$  acétyltrypsine).

c) La présence de benzamidine dans la solution réactionnelle n'a apparemment pas d'influence ni sur le nombre de résidus modifiés ni sur la vitesse de méthylation. Cependant cet inhibiteur peut déplacer le pK d'une tyrosine en la perturbant. On ne peut pas savoir a priori si cette protection amènerait une augmentation ou une diminution de ce pK. Nous verrons plus loin que, par d'autres modifications chimiques, on peut résoudre ce problème.

#### Etude cinétique.

-----

Nous avons étudié l'activité sur BAA de la N  $\epsilon$  acétyltrypsine de la N(O méthyl)<sub>2</sub>  $\epsilon$  acétyltrypsine et de la N(O méthyl)<sub>3</sub>  $\epsilon$  acétyltrypsine entre pH 8,5 et pH 11. La comparaison de l'évolution de la constante d'acylation  $k_2$  et de la constante de Michaelis  $K_s$  en fonction du pH pour ces différentes formes d'enzyme, permet de déterminer le pK apparent des groupes intervenant dans l'activité. En ayant modifié trois tyrosines nous allons pouvoir déterminer si ces acides aminés ont un rôle direct dans l'hydrolyse enzymatique du substrat en comparant les résultats cinétiques avec ceux obtenus pour la N  $\epsilon$  acétyltrypsine. On a tenu compte du titrage du site actif de l'enzyme et les constantes catalytiques ont été corrigées et ramenées toutes à un même pourcentage de ce site.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans les Figures 19 et 20. La Figure 19 donne la variation de  $K_{sapp}$  en fonction du pH et la figure 20 celle de  $\log$  de  $k_{2app}$  en fonction du même paramètre. Pour les trois formes de trypsine dont les groupes  $\epsilon$  aminés des lysines sont bloqués c'est  $K_{sapp}$  qui croît au-dessus de pH 9,5 indiquant une diminution des affinités de ces formes d'enzyme pour le



Figure 19 : Variation de la constante de Michaelis apparente de la benzoyl-L arginine amide en fonction du pH pour la trypsine native, pour la N- $\epsilon$  acétyltrypsine, par la O méthyl<sub>2</sub> N- $\epsilon$  acétyltrypsine, et pour la O méthyl<sub>3</sub> N- $\epsilon$  acétyltrypsine à 25°.

Les concentrations de substrat varient de 1 mM à 10 mM. Les concentrations d'enzyme variant suivant les pH, de 20  $\mu$ g/ml à 50  $\mu$ g/ml. Tampon Tris-HCl 0,02 M- NaCl 0,1 M. ● trypsine native ; □ N -  $\epsilon$  acétyltrypsine ;  $\Delta$  O méthyl<sub>2</sub> N- $\epsilon$  acétyltrypsine ; ▲ O méthyl<sub>3</sub> N- $\epsilon$  acétyltrypsine.

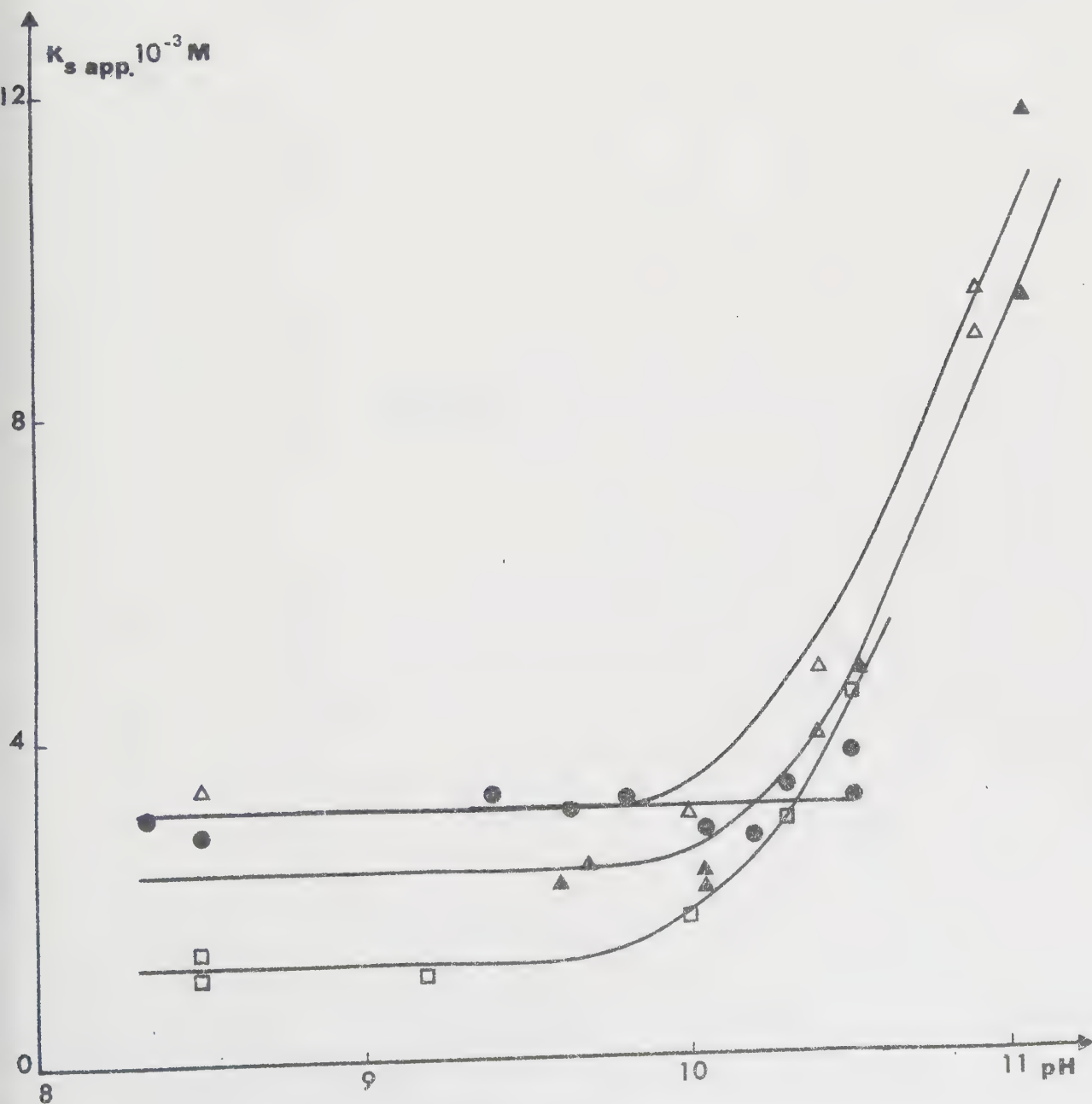
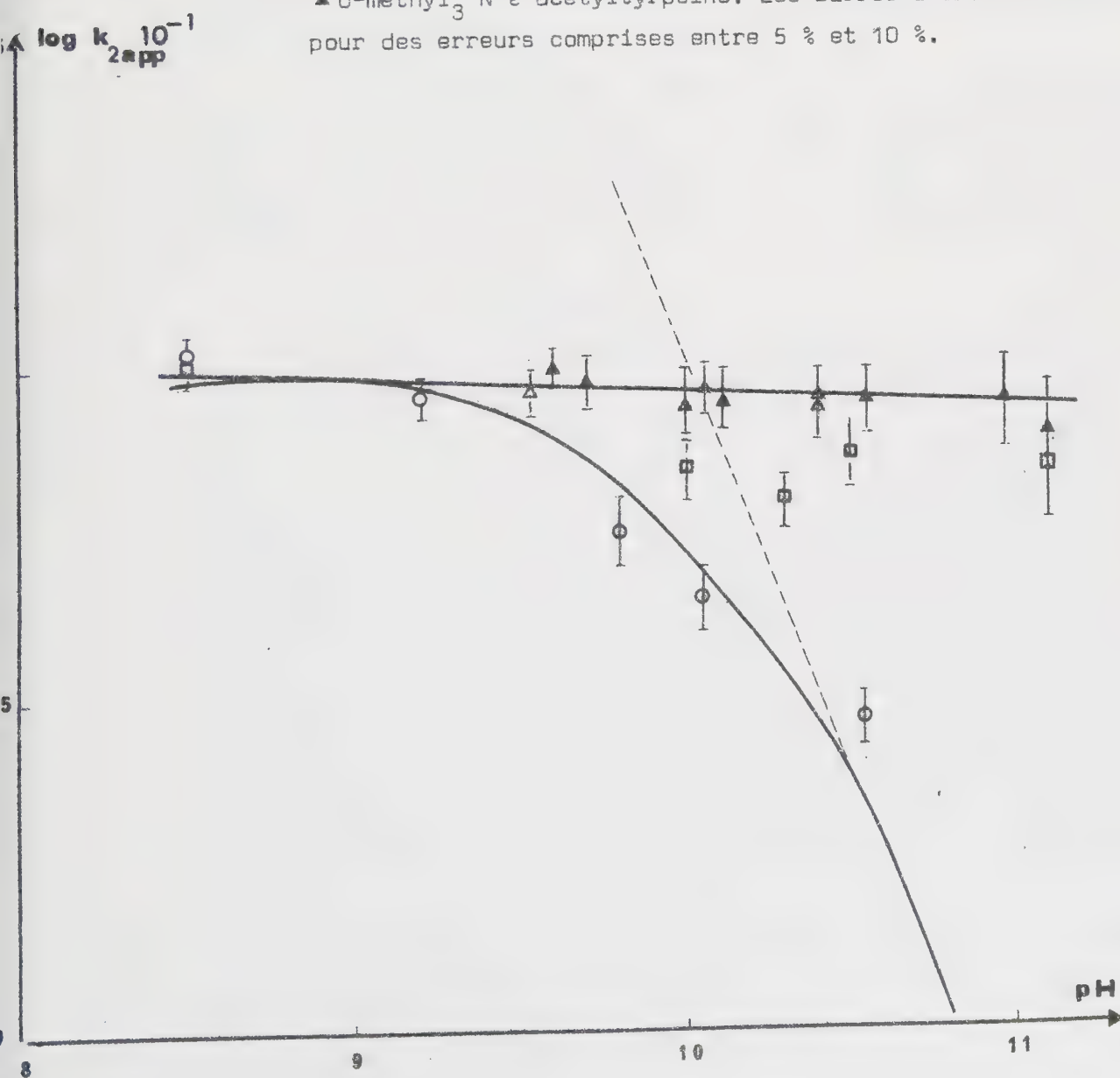




Figure 20 : Variation du logarithme de la constante d'acylation apparente ( $k_{2app}$ ) en fonction du pH pour l'hydrolyse de la benzoyl-L-arginine amide pour la trypsine native, la N- $\epsilon$  acétyltrypsine, la O-méthyl<sub>2</sub> N- $\epsilon$  acétyltrypsine, et la O-méthyl<sub>3</sub> N- $\epsilon$  acétyltrypsine.

Les conditions sont les suivantes : 25° , Tampon Tris-HCl 0,02 M, NaCl 0,1 M et tampon carbonate NaOH 0,02 M, NaCl 0,1 M ;  $\circ$  trypsine native ;  $\square$  N acétyltrypsine ;  $\Delta$  O-méthyl<sub>2</sub>-N- $\epsilon$  acétyltrypsine ;  $\blacktriangle$  O-méthyl<sub>3</sub>-N- $\epsilon$  acétyltrypsine. Les barres d'erreur sont évaluées pour des erreurs comprises entre 5 % et 10 %.





substrat ;  $k_2$  reste constant et décroît très peu. Il est relativement difficile d'évaluer de façon précise le pK apparent du groupe impliqué dans cette dernière variation : il est de l'ordre de 10,3 déterminé suivant la méthode de Dixon (1953). Rappelons que dans le cas de la trypsine native (voir précédemment) le pK apparent du groupe responsable de la diminution de  $k_2$  aux pH alcalins peut être observé à 10,1. Nous avons déjà expliqué, lors de la comparaison entre la trypsine native et la N  $\epsilon$  acétyltrypsine, d'où devaient les différences que l'on observe entre ces deux formes d'enzyme.

Les profils de pH étant semblables pour la N  $\epsilon$  acétyltrypsine et pour les deux formes d'enzyme, on peut donc estimer qu'aucune des tyrosines méthylables, possédant donc un pK d'ionisation aux environs de 10, n'intervient dans le phénomène de variation des constantes cinétiques aux pH alcalins.

#### Discussion et conclusion.

Les observations exposées dans ce chapitre étayent l'hypothèse que le groupe contrôlant l'activité de la trypsine en milieu alcalin et ayant un pK apparent de 10 est bien le groupe  $\alpha$  aminé de l'isoleucine N terminale. Si l'on admet que l'on peut comparer la trypsine native et la N  $\epsilon$  acétyltrypsine comme on l'a montré précédemment, on peut aussi exclure trois des quatre tyrosines accessibles (déterminées par perturbation de solvant) d'un rôle critique vers pH 10. Si l'on admet, avec Tanford (1961) qu'un groupe contrôlant une activité avec un pK donné devrait être titrable dans les mêmes conditions, il ne semble pas que le quatrième de ces résidus soit impliqué, son pK devant être plus élevé que 10 car il ne réagit pas avec le sulfate de méthyle. Bien que cette modification soit faite en présence de 10 % d'éthanol, ce qui élève le pK des groupes phénoliques, nous pensons que cet argument est valable. Nous verrons dans la conclusion qu'une autre série d'expériences peut être tentée pour résoudre sans ambiguïté cette question.

Le groupe  $\alpha$  aminé de la protéine reste donc le seul candidat valable. Son acétylation en urée 2 M détruit vraisemblablement le site actif de l'enzyme, de même que la désamination du résidu N terminal (Scrimger et coll., 1967) abo-



lissant l'activité vis-à-vis de substrats spécifiques. Par sa charge positive en interaction vraisemblablement forte, son pK étant particulièrement élevé, avec un autre résidu de la protéine, il doit contribuer au maintien au voisinage les uns des autres des différents résidus d'acides aminés constituant le site actif.

#### B - Les tyrosines accessibles aux réactifs chimiques ont-elles un rôle au site actif de l'enzyme ?

L'examen de la séquence de la trypsine montre que deux tyrosines (28 et 48) se trouvent à proximité de l'histidine 46 du site actif. Il est donc logique de rechercher si ces deux résidus n'ont pas de rôle dans l'activité. Il est bien évident que, par nos méthodes, nous ne pouvons étudier que les tyrosines accessibles aux réactifs chimiques. Les résidus enfouis à l'intérieur de la protéine ont peut-être un rôle crucial pour le maintien de la conformation mais nous ne pourrions pas le savoir sans dénaturer l'enzyme.

Avant d'étudier plus précisément les données de la littérature sur ce sujet, précisons que nous ne nous occuperons pas du rôle des tyrosines dans la fixation d'inhibiteurs protéiques. Les résultats obtenus par l'étude de l'interaction entre ces protéines inhibitrices de la trypsine et l'enzyme font apparaître qu'il existe certainement plusieurs sites de fixation, zones où interviennent des tyrosines. Nous avons précisé dans l'introduction que seul nous préoccupait le site actif que l'on pouvait révéler pour les "petits" substrats spécifiques.

#### La littérature et le rôle de tyrosines au site actif de l'enzyme.

La plupart des auteurs sont d'accord pour dire qu'un ou plusieurs résidus tyrosines ont un rôle au site actif de la trypsine. Hachimori et coll. (1966), en faisant réagir les résidus tyrosines de l'enzyme avec le fluorure de cyanure, montrent que 6 résidus sont accessibles (résultats en accord avec ceux de Inada et coll. (1964), sur le titrage spectrophotométrique de la protéine). Traitant la diisopropylphosphoryl-trypsine par ce même réactif les auteurs ne peuvent plus substituer que 4 de ces groupes. Par analogie entre leurs résultats et ceux



obtenus par spectrophotométrie de différence par Oppenheimer et coll. (1963) ils concluent à la présence au site actif de la trypsine de deux tyrosines.

Les études spectrophotométrique menées par Benmouyal et coll. (1966) en présence de substrats spécifiques, de Mares-Guia et coll. (1967) avec inhibiteur fixé de façon covalente au site actif, de East et coll. (1968) et de d'Albis et coll. (1967 et 1969) avec la benzamidine et la butylamine mettent en évidence une perturbation sensible des groupes chromophores de tyrosines de l'enzyme. On peut naturellement se demander ce que ces auteurs observent réellement. On a pu noter (Labouesse et coll., 1966) que l'acétylation des tyrosines par l'anhydride acétique, réaction simultanée à celle des groupements  $\epsilon$  aminés des lysines, entraînait une augmentation sensible de l'activité estérasique (Throwbridge et coll., 1963 - Béchet et coll., 1964). On sait, d'autre part, qu'il existe une activation de la trypsine par le substrat dans le cas de l'hydrolyse de certains esters. Il nous a donc paru intéressant d'étudier plus spécifiquement l'effet de l'acétylation des tyrosines sur la cinétique d'hydrolyse des amides et des esters spécifiques de la trypsine pour déterminer si cette substitution modifie les constantes catalytiques de l'enzyme et pour vérifier si le phénomène d'activation par le substrat demeure lorsque les résidus sont acétylés. Nous avons aussi étudié l'influence de cette modification sur les propriétés catalytiques de la N  $\epsilon$  acétyltrypsine méthylée sur les tyrosines.

1°) Influence de l'acétylation des tyrosines par l'acétylimidazole sur l'activité de la N  $\epsilon$  acétyltrypsine. Ce travail a été réalisé avec la collaboration de Mademoiselle Spotorno.

Cette étude a été faite à partir d'une trypsine acétylée sur les groupements  $\epsilon$  aminés. Le N-acétylimidazole a été utilisé comme réactif spécifique d'acétylation des tyrosines. La réaction est menée de la façon suivante : une solution de N  $\epsilon$  acétyltrypsine 0,05 mM est ajustée à pH 7 ; au temps zéro on ajoute 100 fois plus d'acétylimidazole que de trypsine acétylée, de façon à réaliser une concentration 5 mM ; on maintient le pH constant par addition de NaOH 0,5 N. On peut ajouter de nouveau après trente minutes et une heure de réaction des quantités égales d'acétylimidazole pour avoir finalement environ 200 fois plus de réactif que de N  $\epsilon$  acétyltrypsine. On arrête la réaction par filtration sur



une colonne de Sephadex G 50. Pour déterminer le nombre de tyrosines acétylées, on suit, par spectrophotométrie de différence, leur désacétylation par l'hydroxylamine 0,5 M à 25°, pH 7,5 à 275 m $\mu$ . On évalue exactement la concentration d'enzyme mise dans les cuves d'après le spectre d'absorption des solutions d'enzyme après désacétylation.

### Résultats.

#### a) Nombre de tyrosines acétylées.

Sur la figure 21 on voit que l'on peut acétyler de 3,7 à 4,3 résidus de tyrosine par mole de protéine dans les conditions où nous avons expérimenté. Ce chiffre est atteint après deux heures de réaction. Nous avons répété cette expérience en présence de benzamidine à la concentration de 20 mM afin de vérifier les résultats de Houston et coll. (1966) qui décèlent une diminution de l'activité de la trypsine après traitement par l'acétylimidazole en présence de benzamidine. Dans nos conditions expérimentales les résultats sont absolument identiques à ceux que nous obtenons sans benzamidine.

Pour être sûrs qu'aucune tyrosine acétylée n'échappe à la désacétylation par l'hydroxylamine (en supposant, par exemple, qu'un changement de conformation intervenant au cours de la réaction des tyrosines avec l'acétylimidazole masquerait l'une d'entre elles), nous avons traité l'enzyme par l'hydroxylamine 0,5 M en présence d'urée 4 M dans les mêmes conditions de désacétylation que celles utilisées précédemment (pH 7, 25°, 275 m $\mu$ ). On retrouve dans ce cas exactement le même nombre de tyrosines désacétylées. On ne peut donc pas acétyler par l'acétylimidazole plus de quatre tyrosines par mole de N  $\epsilon$  acétyltrypsine.

#### b) Résultats de l'étude cinétique.

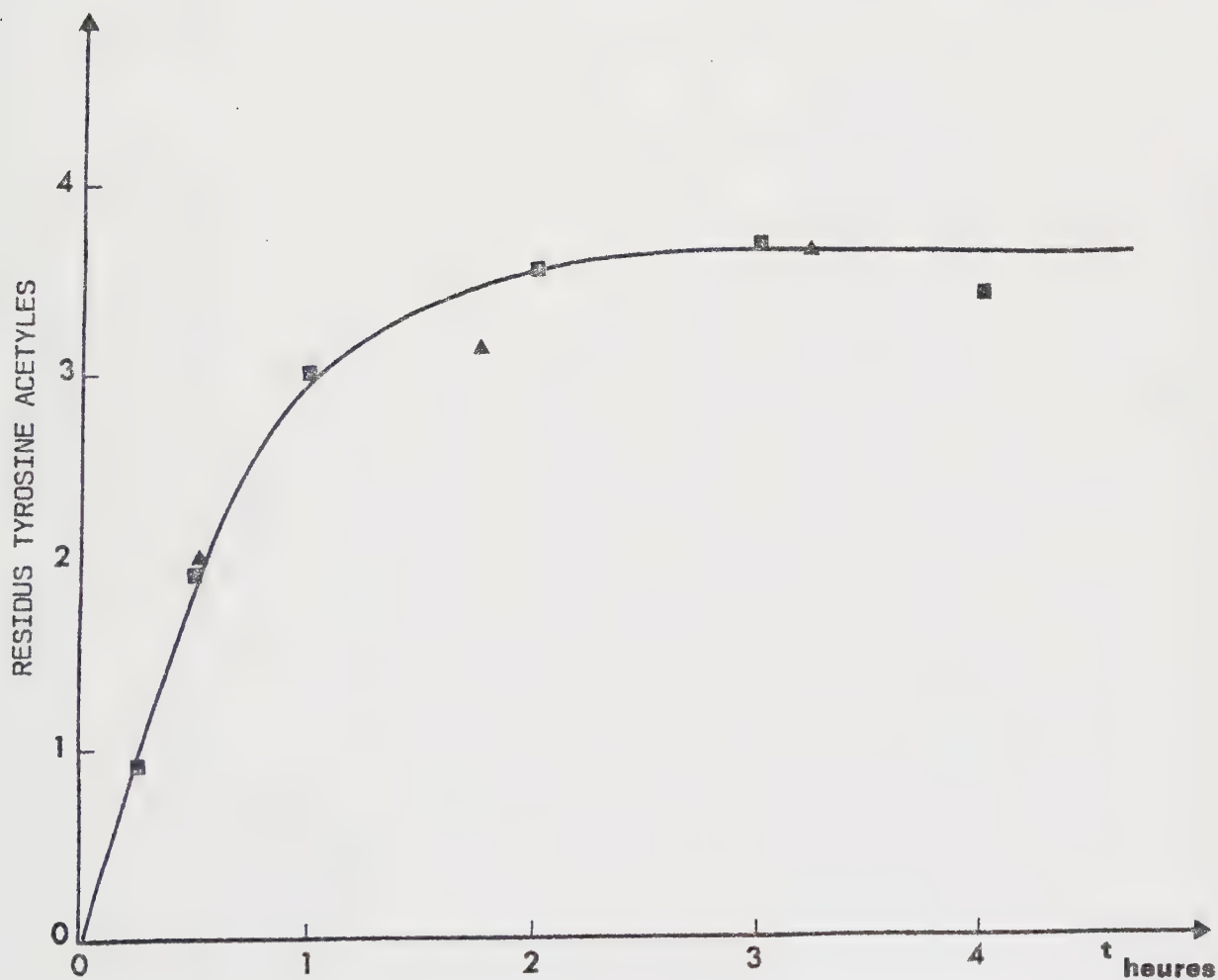
Les lots d'enzyme différemment modifiés sont ramenés au même pourcentage de site actif :

BAEE-BAA - Le Tableau 3 et les Figures 22, 23 et 24 montrent l'ensemble des résultats cinétiques obtenus pour l'hydrolyse du BAEE et du BAA, par les deux formes de l'enzyme (trypsine acétylée et N  $\epsilon$  acétyltrypsine). L'activation par le substrat décelable pour les esters spécifiques dans le cas de la



Figure 21 : Nombre de résidus tyrosine de N ε acétyltrypsine réagissant à l'acétylimidazole en fonction du temps.

Les expériences sont faites dans les conditions suivantes : ■, 25°, pH 7, en présence de N ε acétyltrypsine 45,5 μm et de N acétylimidazole 12 mM (final) ; ▲, de même plus benzamidine 20 mM.





Comparaison des constantes cinétiques d'hydrolyse du BAEE et du BAA par la N ε acétyltrypsine et la N ε acétyltrypsine acétylée sur les résidus tyrosines (N ε,0-acétyltrypsine), à pH 8,4 et à 25 °,  $\mu = 0,1$ .

| Enzyme               | B A E E                                 |                                                        |                                         |                                                        | B A A                                     |                                         |
|----------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------|
|                      | (K <sub>m</sub> app) <sub>1</sub><br>mM | (k <sub>3</sub> app) <sub>1</sub><br>sec <sup>-1</sup> | (K <sub>m</sub> app) <sub>2</sub><br>mM | (k <sub>3</sub> app) <sub>2</sub><br>sec <sup>-1</sup> | K <sub>m</sub> app = K <sub>s</sub><br>mM | k <sub>2</sub> app<br>sec <sup>-1</sup> |
| N ε acétyltrypsine   | 0,003                                   | 20                                                     | 9                                       | 31                                                     | 1,08                                      | 1,04                                    |
| N ε,0-acétyltrypsine | 0,0016                                  | 31                                                     | 8,4                                     | 44,5                                                   | 1,15                                      | 1,4                                     |

K<sub>m</sub> app est la constante de Michaelis apparente et k<sub>3</sub> app la constante de vitesse de désacylation pour l'hydrolyse du BAEE. L'indice ( )<sub>1</sub> est utilisé dans une zone de concentration où il n'y a pas d'activation par le substrat (10 μM < S < 20 μM). L'indice ( )<sub>2</sub> est utilisé pour des concentrations supérieures à 5 mM où on voit une activation par le substrat. K<sub>m</sub> = K<sub>s</sub> est la constante de Michaelis vraie et k<sub>2</sub> app la constante de vitesse d'acylation pour l'hydrolyse du BAA (0,1 mM < S < 20 mM).



Figure 22 :

Détermination des paramètres cinétiques pour les substrats spécifiques BAEF et TAME aux faibles concentrations de substrat.

$20 \mu\text{M} > \{S\} > 1 \mu\text{M}$  ;  $\{E\} = 0,026 \mu\text{M}$  ; Tris-HCl  $1\text{mM}$  à  $\text{pH} = 8,35$  ; ClNa  $0,1\text{M}$  ;  $25^\circ$  ;  $\blacktriangle$  N- $\epsilon$  acétyltrypsine et BAEF ;  $\triangle$  N- $\epsilon$  O acétyltrypsine et TAME ;  $\bullet$  N- $\epsilon$  -O- acétyltrypsine et BAEF ;  $\circ$  , N-  $\epsilon$  -O acétyltrypsine et TAME.

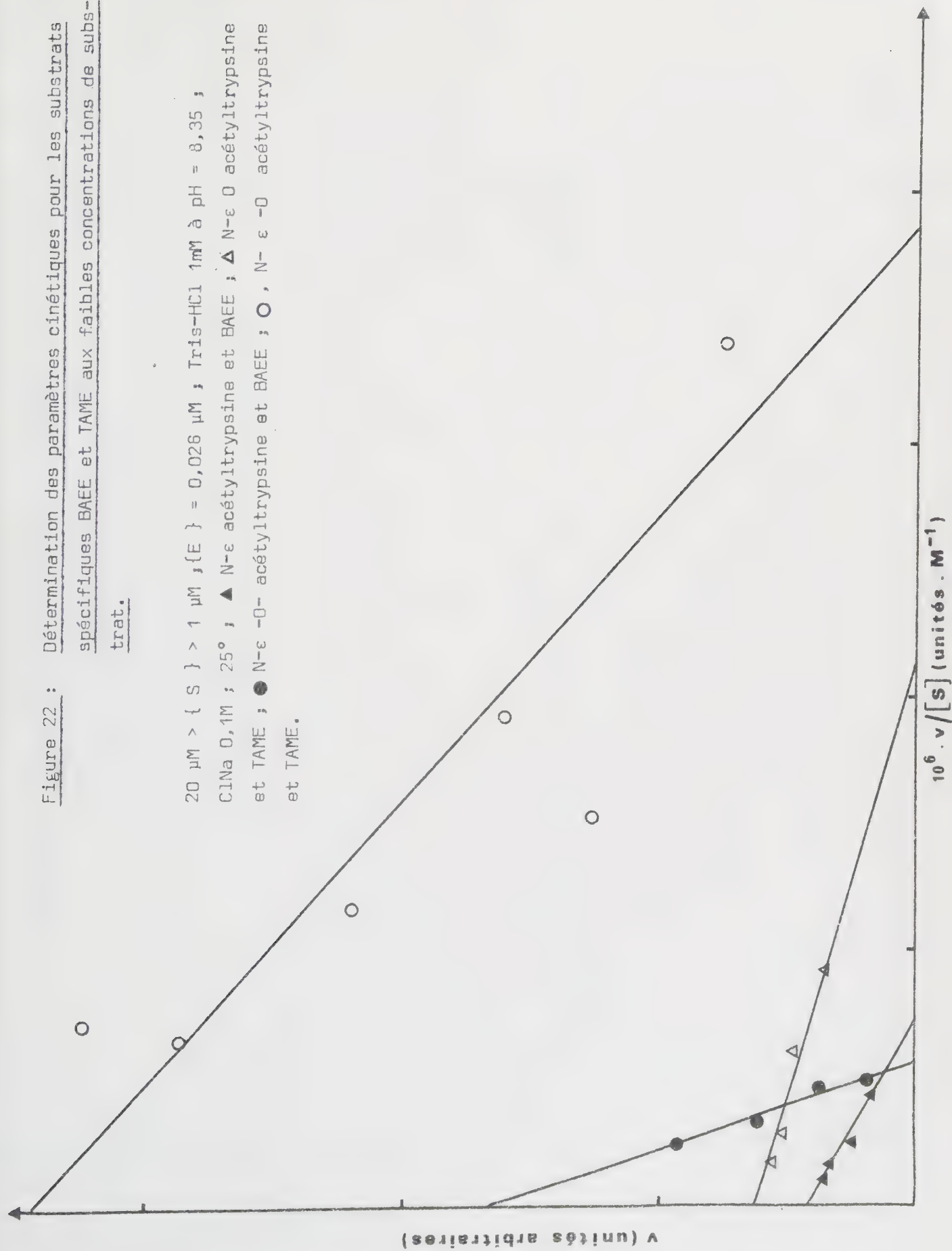




Figure 23 : Détermination des paramètres cinétiques de l'hydrolyse enzymatique du BALE  
 par la N ε acétyltrypsine ( O ) et par la N-ε O acétyltrypsine ( ■ ) aux  
 fortes concentrations en substrat.

Les concentrations en substrat sont respectivement comprises entre 3,75 mM et 0,1 M dans le cas de la N ε acétyltrypsine, et entre 1,25 mM et 0,1 M dans le cas de la N-ε O acétyltrypsine . La représentation de Eadie pour la tyrosine native se confond avec la courbe inférieure.

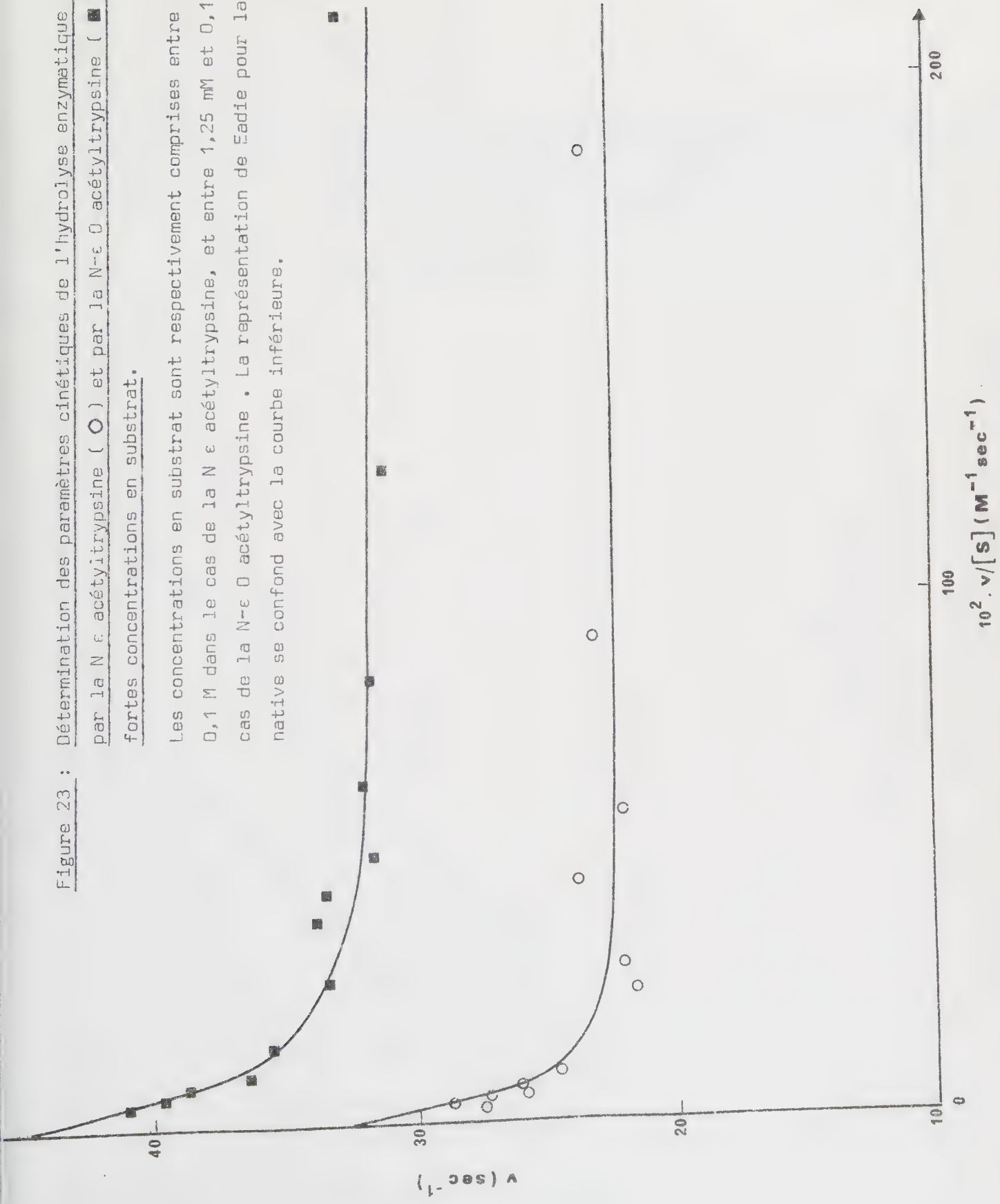
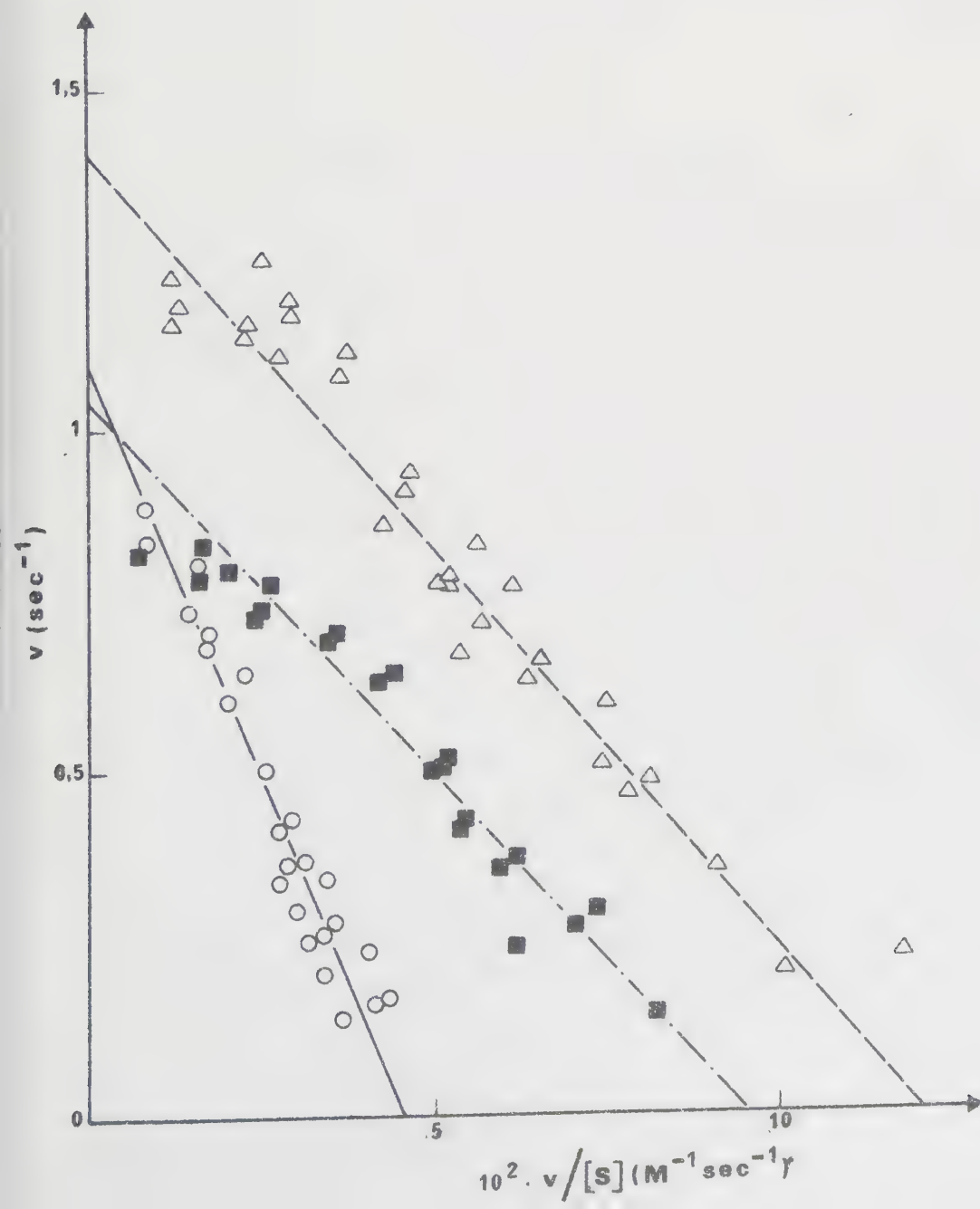




Figure 24 : Détermination des paramètres cinétiques de l'hydrolyse enzymatique du BAA par la trypsine native (○), la N-ε acétyltrypsine (■) et la N-ε,0 acétyltrypsine (Δ).

Les mesures sont ramenées à 1 mole d'enzyme par litre de solution réactionnelle.





trypsine existe toujours et de façon plus nette, semble-t-il, pour la N  $\epsilon$  O-acétyltrypsine. Nous avons vérifié par ailleurs que, après désacétylation des tyrosines de la N  $\epsilon$  O-acétyltrypsine, nous retrouvons les mêmes constantes catalytiques que pour la N  $\epsilon$  acétyltrypsine de départ.

TAME-TAA - Avec le Tableau 4 et les Figures 22, 25 et 26 sont présentés les résultats obtenus pour les substrats TAME et TAA. Comme dans le cas des deux autres substrats (BAEE et BAA) les constantes de vitesse sont évaluées graphiquement à partir des représentations d'Eadie. Dans la zone d'activation par le substrat avec le TAME l'erreur sur la constante de vitesse de désacétylation peut atteindre 15 %.

### Discussion.

#### a) Nombre de tyrosines acétylées.

Nous n'avons pas pu acétyler plus de quatre tyrosines par mole de N  $\epsilon$  acétyltrypsine dans nos conditions opératoires. Ce fait suggère que 4 des 10 groupes phénoliques de l'enzyme sont plus réactifs à l'acétylimidazole que les autres. On peut rapprocher ce résultat des expériences de perturbation de solvant (voir précédemment). Cependant cette situation particulière de 4 résidus phénoliques ne se retrouve pas en examinant les courbes de titrage spectrophotométrique de la trypsine acétylée : tous les groupes phénols sont titrés indépendamment les uns des autres avec un pK expérimental global de 10,9 en NaCl 0,1 M à 25°, sans qu'il soit possible de mettre en évidence l'existence d'un groupe de résidus de pK nettement différent (voir chapitre précédent).

Il faut noter ici que la détermination du nombre de tyrosines acétylées est statistique. Par ces expériences il n'est donc pas possible de dire si les phénomènes observés sont la conséquence de la substitution d'une tyrosine particulière ou réellement le résultat de la substitution de quatre tyrosines.

#### b) Résultats cinétiques.

Nous admettons ici le schéma cinétique suivant dans les conditions où il n'y a pas d'activation par le substrat et au pH optimum où nous travaillons (voir partie cinétique) :



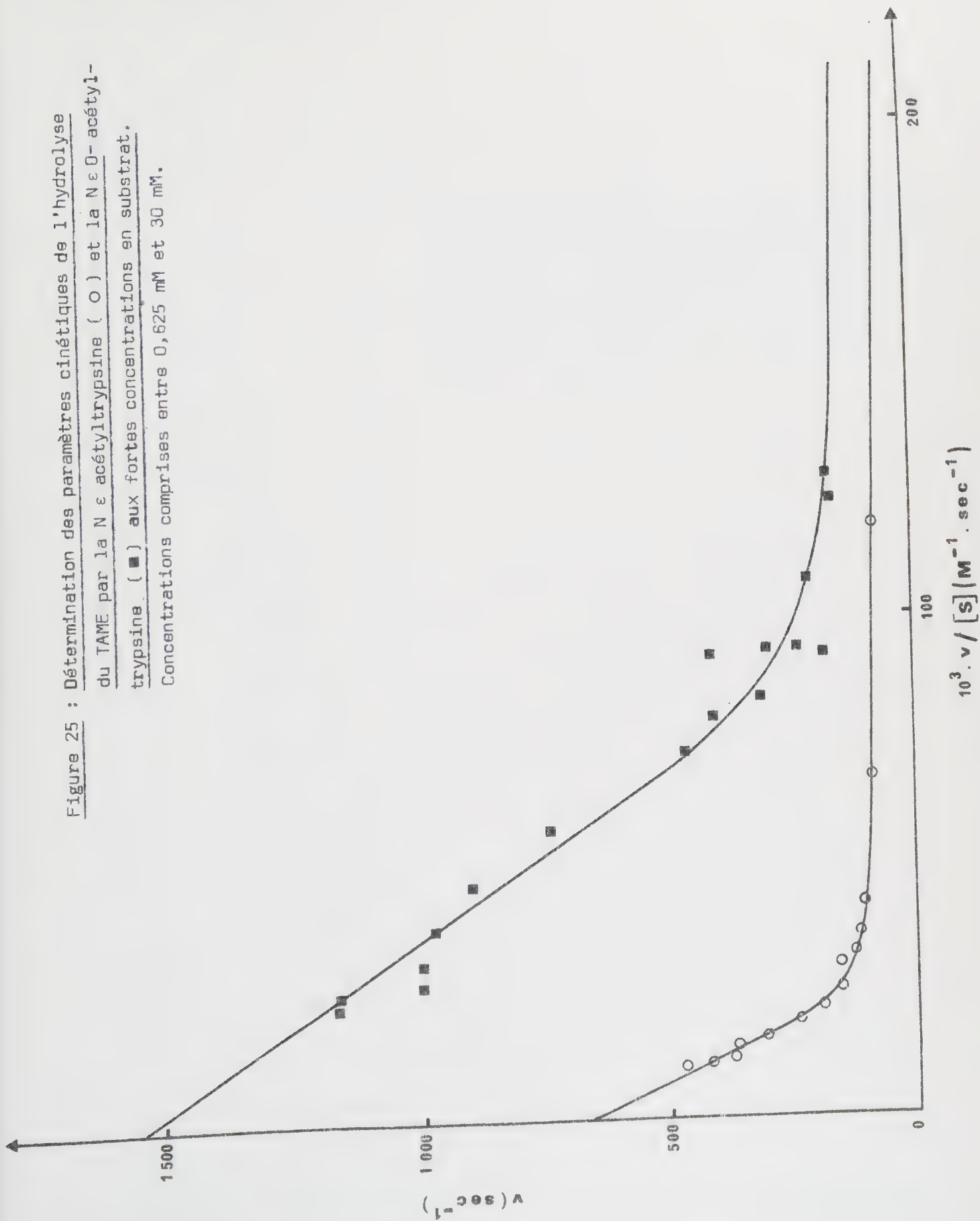
Comparaison des constantes cinétiques d'hydrolyse du TAME et du TAA par la N  $\epsilon$  acétyltrypsine et la N  $\epsilon$  acétyltrypsine acétylée sur les résidus tyrosine (N  $\epsilon$ ,O-acétyltrypsine), à pH 8,4 et 25 °,  $\mu$  = 0,1.

| Enzyme.                        | T A M E               |                       |                       | T A A                 |                         |                   |
|--------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------|
|                                | $(K_m \text{ app})_1$ | $(k_3 \text{ app})_1$ | $(K_m \text{ app})_2$ | $(k_3 \text{ app})_2$ | $K_m \text{ app} = K_s$ | $k_2 \text{ app}$ |
|                                | mM                    | sec <sup>-1</sup>     | mM                    | sec <sup>-1</sup>     | mM                      | sec <sup>-1</sup> |
| N $\epsilon$ acétyltrypsine    | 0,014                 | 90                    | 42                    | 680                   | 3,8                     | 1,9               |
| N $\epsilon$ ,O-acétyltrypsine | 0,006                 | 180                   | 30                    | 1 500                 | 2,3                     | 2,6               |

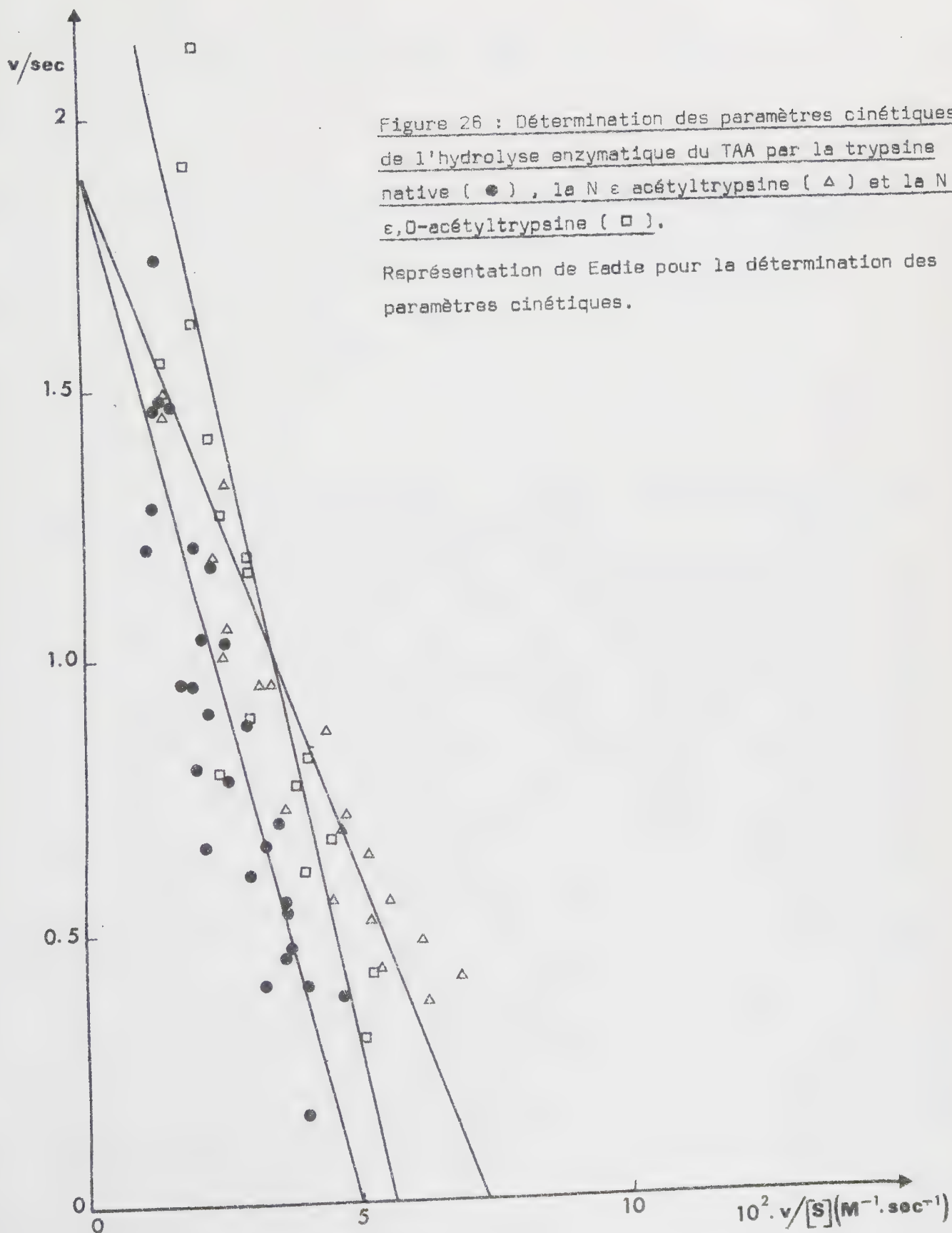
Même présentation que pour le Tableau 1. Pour le TAME, les deux zones de concentrations en substrat ont été : 1  $\mu$ M < S < 20  $\mu$ M pour la non-activation par le substrat et S < 3 mM pour la zone d'activation par le substrat. Pour l'hydrolyse du TAA, les expériences ont été réalisées avec 0,4 mM < S < 12,5 mM.



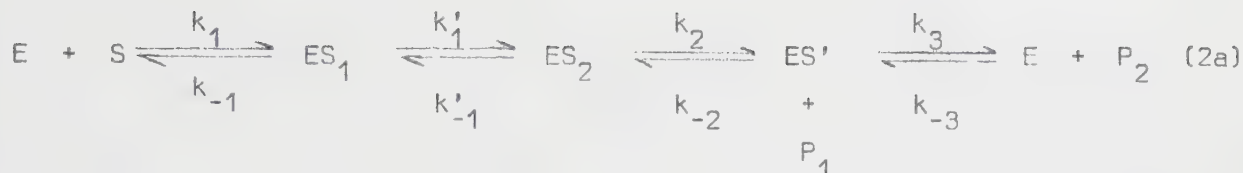
Figure 25 : Détermination des paramètres cinétiques de l'hydrolyse  
du TAME par la N ε acétyltrypsine ( O ) et la N ε O- acétyl-  
trypsine ( ■ ) aux fortes concentrations en substrat.  
Concentrations comprises entre 0,625 mM et 30 mM.











La signification des différents termes a déjà été donnée précédemment. Nous avons vu que dans la zone d'activation par le substrat les cinétiques peuvent être de la forme (comme nous l'avons vu dans la partie cinétique) :

$$v = \frac{a(S) + b(S)^2}{1 + c(S) + d(S)^2} \quad (E)$$

où  $a$ ,  $b$ ,  $c$  et  $d$  sont des constantes dans les conditions de pH et de température bien déterminées.

- Comparaison des valeurs de  $K_{m \text{ app}}$  et de  $K_s$  pour les substrats étudiés avec les deux formes d'enzyme et la trypsine native.

Pour les substrats BAEE et BAA les constantes de Michaelis apparentes  $K_{m \text{ app}}$  et les  $K_s$  sont pratiquement identiques pour les trois enzymes. Dans le cas de l'ester la concordance, compte tenu des difficultés d'extrapolation surtout dans la zone d'activation par le substrat, est bonne. Pour le BAA la valeur du  $K_s$  pour la N $\epsilon$  acétyltrypsine est pratiquement la même. On note un accroissement des constantes d'acylation ( $k_{2 \text{ app}}$ ) et de désacylation ( $k_{3 \text{ app}}$ ) (Tableau 4).

Pour les substrats TAME et TAA les conclusions sont les mêmes bien que les valeurs des  $K_{m \text{ app}}$  et  $K_s$  ne soient pas aussi concordantes que pour les substrats benzoylés. Il est délicat d'extrapoler les valeurs des constantes de Michaelis apparentes dans la zone de fortes concentrations en substrats dans le cas du TAME, le phénomène d'activation étant alors particulièrement prononcé. Les différences observées dans les valeurs de  $K_s$  pour les différentes formes d'enzyme avec le TAA ne sont pas significatives à notre avis.

- Comparaison des constantes d'acylation et de désacylation.

Le tableau 5 donne les rapports de vitesse d'acylation et de désacylation pour la trypsine native, la N $\epsilon$  acétyltrypsine et la N $\epsilon$ Oacétyltrypsine. On note la même augmentation des constantes d'acylation de l'ordre de 1,3 fois avec les amides BAA et TAA lorsqu'on passe des enzymes dont les résidus tyrosine ne sont



Comparaison des rapports des constantes de vitesse d'acylation ( $k_2$ ) et de désacylation ( $k_3$ ) pour la trypsine native (T), la N  $\epsilon$  acétyltrypsine (N-AcT) et la N  $\epsilon$  acétyltrypsine acétylée sur les résidus tyrosine (N,O-AcT).

| Amides    |       | Rapport des $k_2$                                   |  | Esteré  |           |
|-----------|-------|-----------------------------------------------------|--|---------|-----------|
| B A A     | T A A |                                                     |  | B A E E | T A M E   |
| env. 0,96 | 1     | $\frac{k_2 \text{ (N-AcT)}}{k_2 \text{ (T)}}$       |  | (1)     | (2)       |
| 1,28      | 1,3   | $\frac{k_2 \text{ (N,O-AcT)}}{k_2 \text{ (T)}}$     |  | env. 1  | env. 1,35 |
| 1,35      | 1,36  | $\frac{k_2 \text{ (N,O-AcT)}}{k_2 \text{ (N-AcT)}}$ |  | 1,51    | 2,12      |
|           |       |                                                     |  | 1,43    | 3         |
|           |       |                                                     |  | 1,53    | 2         |
|           |       |                                                     |  | 1,43    | 2,2       |

Les valeurs des constantes de vitesses sont prises dans les Tableaux 1 et 2. Pour les esters, la colonne (1) correspond aux rapports des constantes de vitesse ( $k_3/k_1$ ) dans la zone de non activation par le substrat ; la colonne (2) correspond aux rapports des constantes de vitesse ( $k_3/k_2$ ) dans la zone d'activation par le substrat.

Remarques. Nous avons adopté pour la commodité de l'écriture les abréviations suivantes : N-AcT pour N acétyltrypsine, N,O-AcT pour la N et acétyltrypsine (acétylée sur 4 tyrosines), et T pour la trypsine native.

Les constantes cinétiques portées dans ce Tableau sont des constantes apparentes.



$$\frac{k_{2 \text{ app}} (\text{N,O-AcT})}{k_{2 \text{ app}} (\text{N-AcT})} \quad \text{ou} \quad \frac{k_{2 \text{ app}} (\text{N,O-AcT})}{k_{2 \text{ app}} (\text{T})}$$

pas acétylés (T et N ε acétyltrypsine) à celui où les résidus tyrosine sont acétylés (N,O-AcT). On remarque en outre que le rapport

$$\frac{k_{3 \text{ app}} (\text{N-AcT})}{k_{3 \text{ app}} (\text{T})}$$

est de l'ordre de 1, ce qui exclut toute influence de l'acétylation des ε NH<sub>2</sub> dans l'accroissement des constantes de vitesse, et prouve que l'effet observé est spécifiquement une conséquence de l'acétylation des tyrosines et non de celles des ε NH<sub>2</sub> des lysines. Cette observation est corroborée par le fait que les constantes cinétiques d'hydrolyse d'un ester particulier, le BAEE, par une N ε ,O-acétyltrypsine traitée par l'hydroxylamine sont les mêmes que celles obtenues avec la N ε acétyltrypsine.

Dans le cas des constantes de désacylation, avec les esters, on retrouve le même phénomène. Pour le BAEE l'augmentation des constantes de vitesse de désacylation est légèrement plus importante que dans le cas des constantes de vitesse d'hydrolyse du BAA lorsqu'on passe de la trypsine et de la N ε acétyltrypsine à la N ε O-acétyltrypsine. Mais l'effet est le même dans la zone de non activation par le substrat que dans la zone où se manifeste ce phénomène (rapports des constantes  $k_3$  peu différents de 1,6 à 1,4). Dans le cas de TAME les conclusions sont identiques. L'effet d'accroissement des valeurs des constantes de vitesse est plus marqué pour ce substrat que pour le BAEE. Par ailleurs, le rapport :

$$\frac{k_{3 \text{ app}} (\text{N-AcT})}{k_{3 \text{ app}} (\text{T})}$$

reste pratiquement égal à 1 comme dans le cas du rapport des  $k_2$  pour les amides.

On ne décèle pas d'effet de l'acétylation des tyrosines sur le phénomène d'activation par le substrat.



Il n'est pas possible pour l'instant d'expliquer pourquoi l'acétylation de quatre tyrosines augmente les constantes d'acylation et de désacylation. Normalement la présence d'un groupement phénolique à proximité d'une liaison ester à rompre pourrait accroître la vitesse de cette réaction (Bruice et coll., 1966). Ici l'effet est inverse. On peut aussi supposer que la présence de groupes phénoliques acétylés à proximité du centre actif (la tyrosine 48 par exemple si ce résidu est accessible au réactif) modifie la polarité de l'environnement du site catalytique et de ce fait augmente les constantes de vitesse. C'est une hypothèse que nous ne pouvons pas vérifier. Nous excluons a priori que l'acétylation des tyrosines modifie le pK des groupes directement impliqués dans la catalyse (l'histidine 46 en particulier), ce qui déplacerait le pH optimum, les constantes de vitesse  $k_2$  app et  $k_3$  app étant augmentées par rapport à la trypsine et non pas diminuées.

Nous ne retrouvons pas le phénomène d'inactivation observé par Houston et coll. en cours d'acétylation de la trypsine par l'acétylimidazole en présence et en absence de benzamidine. Le traitement que nous faisons subir à la protéine après acétylation pour pouvoir mesurer ensuite l'activité de l'enzyme n'est pas le même que celui qu'utilisent ces auteurs. Il est donc difficile de comparer nos résultats aux leurs. Nous pensons cependant que le phénomène d'inactivation observé provient de l'acétylation de la sérine très réactive du site actif. La mesure d'activité étant alors faite immédiatement sans traitement par l'hydroxylamine, la sérine n'est pas, ou peu, désacétylée : la diminution d'activité peut alors aisément s'expliquer.

En revanche nos résultats concordent qualitativement avec ceux de Trenholm et coll. (1966-1967). Cependant les valeurs des constantes de vitesse pour l'hydrolyse des différents substrats par la trypsine, obtenues ici, sont et plus particulièrement dans le cas de la trypsine, trois fois plus importantes. Nos conditions expérimentales de réaction enzymatique diffèrent de celles de ces auteurs sur deux points principalement : d'une part une force ionique légèrement différente, d'autre part la présence de borate 0,1 M dans le tampon utilisé par Trenholm et coll.. La force ionique n'a aucun effet sensible au pH optimum sur ces constantes catalytiques. Nous avons vérifié ce résultat qui est en accord,



par ailleurs, avec ceux de Béchet et coll. (1966). En revanche nous avons décelé un effet inhibiteur du borate dans le cas de l'hydrolyse du TAA par la trypsine et la N  $\epsilon$  acétyltrypsine mais pas par la N  $\epsilon$ ,O-acétyltrypsine. Les constantes d'acylation diminuent de 40 % environ lors de l'hydrolyse du TAA par les deux premières formes d'enzyme et les valeurs de  $K_s$  varient sensiblement. De ce fait on peut penser que le borate agit par interaction avec les groupes hydroxyles libres des tyrosines et que cette interaction n'a pas lieu lorsqu'ils sont acétylés. Berezin et coll. (1966) admettent une action inhibitrice du borate par interaction avec l'histidine du centre actif de l' $\alpha$ -chymotrypsine. Si ce phénomène est le même pour la trypsine on ne le décèle pas ici. Remarquons cependant que l'effet du borate est mis en évidence ici dans le cas de l'hydrolyse d'une amide, c'est-à-dire dans l'étape d'acylation alors que Berezin et coll. étudiaient le phénomène dans le cas de l'hydrolyse de l'ester para-nitrophénilique de l'acide acétique, c'est-à-dire d'une réaction dont la vitesse est limitée par l'étape de désacylation.

En résumé il semble bien établi que l'on peut acétyler par l'acétylimidazole quatre tyrosines de la N  $\epsilon$  acétyltrypsine. Cette transformation seule des groupements phénoliques des tyrosines s'accompagne principalement d'une augmentation des constantes de vitesse d'acylation et de désacylation. Cette augmentation est indépendante du phénomène d'activation par le substrat, sans pour autant le supprimer. Le travail présenté ici ne permet pas de dire par quel mécanisme l'acétylation des tyrosines modifie les valeurs des constantes de vitesse. Il n'est pas exclu que l'acétylation de la tyrosine 48 seule pourrait être responsable de ce phénomène.

## 2°) Tentative de distinction des tyrosines accessibles à l'acétylimidazole.

L'effet d'acétylation des tyrosines porte essentiellement sur l'augmentation des constantes catalytiques d'acylation et de désacylation dans le même rapport. Nous avons vu que nous pouvions méthyler par le sulfate de méthyle 2 puis 3 groupes phénoliques de tyrosines de la N  $\epsilon$  acétyltrypsine. Le comportement cinétique des deux formes méthylées de l'enzyme a déjà été décrit précédemment. Nous avons couplé les réactions de méthylation et d'acétylation pour voir si les 4 tyrosines acétylées de la N  $\epsilon$ ,O-acétyltrypsine étaient toutes responsables de



l'augmentation des paramètres cinétiques. Cette étude, pensions-nous, allait nous permettre de mieux savoir si les tyrosines accessibles ont un rôle au site actif de l'enzyme. Nous avons donc étudié l'effet de ces deux modifications chimiques sur le comportement des différentes formes de l'enzyme vis-à-vis du TAME pour lequel l'activation par le substrat est la plus nette.

Le Tableau 6 présente les résultats des différentes modifications chimiques subies par les tyrosines de la N  $\epsilon$  acétyltrypsine. La réaction de méthylation a été décrite précédemment. L'acétylation par l'acétylimidazole des deux formes méthylées de l'enzyme se fait exactement dans les mêmes conditions que l'acétylation de la trypsine acétylée sur les lysines. Les méthodes de mesure du nombre de tyrosines acétylées et de la concentration de l'enzyme ont déjà été discutées plus haut.

Les études cinétiques se feront donc sur 6 formes d'enzyme à des stades de modification chimique différents : la N  $\epsilon$  acétyltrypsine, la N  $\epsilon$ ,O-acétyltrypsine, les deux formes de la N Ométhyle  $\epsilon$  acétyltrypsine et les deux formes correspondantes acétylées par l'imidazole. L'activité est mesurée, comme d'habitude, à pH 8,35 et 25° en NaCl 0,1 M avec des concentrations d'enzyme variant entre 0,7  $\mu$ g et 1  $\mu$ g par ml suivant les concentrations du substrat.

### Résultats.

Avec la figure 27 nous présentons l'effet des différentes modifications chimiques des tyrosines sur le phénomène d'augmentation des constantes catalytiques de désacylation dans la zone d'activation par le substrat, au pH optimum. Les résultats sont donnés dans le Tableau 7.

Les valeurs des paramètres cinétiques sont déterminées d'après les droites de la figure 27. L'observation attentive de cette figure semble montrer que les pentes des droites correspondant à l'hydrolyse du TAME par la N  $\epsilon$ ,O-acétyltrypsine et la N(O-méthyl)<sub>2</sub>  $\epsilon$  acétyltrypsine sont plus faibles que celles obtenues pour les autres formes modifiées de l'enzyme. Nous pensons cependant que, devant la grande valeur des constantes d'affinité ainsi évaluées (de l'ordre de  $3.10^{-2}$  M), la variation observée n'est pas significative.



Résultats des différentes modifications chimiques subies par les tyrosines de la N ε acétyltrypsine.

| FORMES D'ENZYME                                                    | TRAITEMENT CHIMIQUE                                                                                                                                               | NOMBRE DE<br>TYROSINES<br>ACÉTYLÉES | NOMBRE DE<br>TYROSINES<br>MÉTHYLÉES | NOMBRE TOTAL<br>DE TYROSINES<br>MODIFIÉES |
|--------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------------|
| N ε O-acétyltrypsine                                               | Acétylation par l'acétylimidazole pH 7,<br>25° - 3 heures                                                                                                         | 3,7-4,4                             | 0                                   | 4,3-3,7                                   |
| N(O-méthyl) <sub>2</sub> ε acétyltrypsine                          | Méthylation par le sulfate de méthyle<br>pH 10, 2°, 1 heure, en présence de<br>benzamidine 20 mM                                                                  | 0                                   | 2                                   | 2                                         |
| N(O-méthyl) <sub>3</sub> ε acétyltrypsine                          | Méthylation par le sulfate de méthyle<br>pH 10, 2°, 4 heures, en présence de<br>benzamidine 20 mM                                                                 | 0                                   | 3,2-2,9                             | 2,9-3,2                                   |
| N(O-méthyl) <sub>2</sub> O-acétyl <sub>2</sub><br>ε acétyltrypsine | Méthylation par le sulfate de méthyle<br>pH 10, 2°, 1 heure, en présence de<br>benzamidine 20 mM - puis acétylation<br>par l'acétylimidazole pH 7, 25°, 3 heures  | 2,3-2,1                             | 1,9-2,05                            | 4-4,3                                     |
| N(O-méthyl) <sub>3</sub> O-acétyl <sub>1</sub><br>ε acétyltrypsine | Méthylation par le sulfate de méthyle<br>pH 10, 2°, 4 heures, en présence de<br>benzamidine 20 mM - puis acétylation<br>par l'acétylimidazole pH 7, 25°, 3 heures | 1,2                                 | 2,9-3,2                             | 4,1-4,4                                   |



Figure 27 : Détermination des paramètres d'hydrolyse du TAME par différentes formes de trypsine acétylées aux fortes concentrations de substrat.

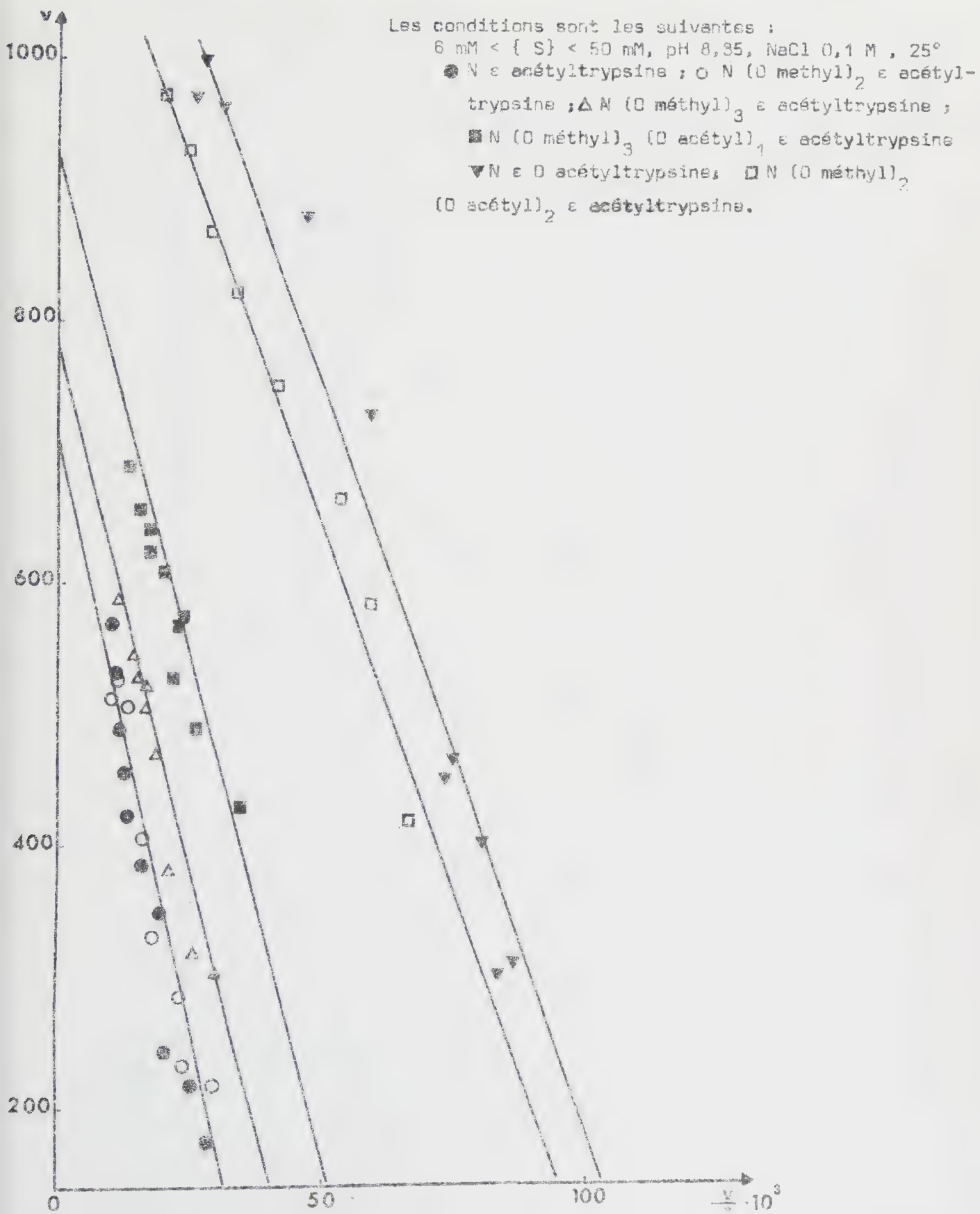




TABLEAU 7

Constantes catalytiques d'hydrolyse du tosyl-L-arginine méthyl ester par différentes formes de trypsine.

| Forme de l'enzyme                 | N ε : acétyltrypsine | N(O-méthyl) <sub>2</sub> ε : acétyltrypsine | N(O-méthyl) <sub>3</sub> ε : acétyltrypsine | N(O-méthyl) <sub>2</sub> ε : (O-acétyl) <sub>2</sub> ε : acétyltrypsine | N(O-méthyl) <sub>3</sub> ε : (O-acétyl) <sub>1</sub> ε : acétyltrypsine | N ε O- : acétyltrypsine |
|-----------------------------------|----------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| (k <sub>3</sub> app) <sup>2</sup> | 650                  | 650                                         | 720                                         | 1 400                                                                   | 950                                                                     | 1 500                   |
| sec <sup>-1</sup>                 | 680                  |                                             |                                             |                                                                         |                                                                         |                         |
| (K <sub>m</sub> app) <sup>2</sup> | 30                   | 30                                          | 30                                          | 25                                                                      | 30                                                                      | 25                      |
| mM                                | 42                   |                                             |                                             |                                                                         |                                                                         |                         |



## Discussion.

### 1°) Validité de la détermination du nombre de tyrosines méthylées et acétylées.

Nous avons discuté la validité de la méthode d'évaluation du nombre de tyrosines méthylées dans la partie expérimentale. Rappelons que ces mesures sont effectuées avec au maximum 5 % d'erreur. De leur côté les déterminations du nombre de tyrosines substituées par le groupement acétyle, dans les conditions de concentration en protéine où l'on se trouve, se fait avec à peu près le même pourcentage d'erreur. L'ensemble des résultats donnés dans le Tableau 6 montre bien que nous ne pouvons substituer que quatre groupes phénoliques au total, quelle que soit la voie choisie. Le fait qu'après méthylation de 2 ou de 3 tyrosines on ne puisse acétyler que 1 ou 2 tyrosines montre bien que la première substitution ne modifie aucunement l'accessibilité des tyrosines de la protéine. On peut donc penser que la méthylation ne modifie pas de façon sensible la conformation de la molécule. Nous supposons naturellement, dans tous les raisonnements qui suivront, que ce sont les mêmes résidus tyrosines qui réagissent avec l'acétylimidazole d'une part et avec le sulfate de méthyle d'autre part. Les plus accessibles, donc ceux dont le pK est le moins alcalin (9,5-10) réagissent seuls, comme on l'a vu, avec le sulfate de méthyle.

2°) Si l'on tient compte de l'erreur de 15 % que l'on fait lorsqu'on extrapole ces courbes dans la zone d'activation par le substrat où nous avons travaillé ici, on peut dire :

a - que les deux tyrosines qui sont le plus rapidement méthylées n'ont aucun rôle dans le phénomène d'augmentation des constantes de vitesse décrit précédemment. En effet, et la constante de désacylation et la constante de Michaelis apparente ont la même valeur, aux erreurs d'approximation près, pour la N $\epsilon$  acétyltrypsine et la N,O(méthyl)<sub>2</sub>  $\epsilon$  acétyltrypsine (Tableau 7). Rappelons que ces deux résidus ne sont pas responsables du pK de 10. On peut donc totalement les éliminer de toute action dans l'activité de l'enzyme pour les petits substrats que nous avons étudiés.



b - que le phénomène d'accroissement des constantes de vitesse est dû à la substitution des deux autres tyrosines;  $(k_3)_2$  pour la  $N(O\text{-méthyl})_3$  O-acétyl $_1$   $\epsilon$  acétyltrypsine et pour la  $N(O\text{-méthyl})_3$   $\epsilon$  acétyltrypsine est supérieure à la même constante évaluée pour la N  $\epsilon$  acétyltrypsine et pour la  $N(O\text{-méthyl})_2$   $\epsilon$  acétyltrypsine. La conclusion logique est que ces deux résidus accessibles (tous les deux par acétylation et l'un des deux par méthylation) sont responsables de ce phénomène. La différence observée entre  $(k_3)_2$  pour la  $N(O\text{-méthyl})_3$   $\epsilon$  acétyltrypsine et pour la  $N(O\text{-méthyl})_2$   $\epsilon$  acétyltrypsine est faible, mais à notre avis, peut être significative ( $650 \text{ sec}^{-1}$  à  $720 \text{ sec}^{-1}$ ) alors que  $(k_m)_2$  est inchangé. La substitution par le groupe méthyle a moins d'effet que la fixation d'un acétyle sur le OH phénolique.

Nous avons replacé ces résultats dans la discussion plus générale du rôle éventuel des tyrosines accessibles au site actif de l'enzyme. Les résultats présentés dans ce paragraphe montrent qu'il est possible de distinguer entre elles les quatre tyrosines de la trypsine qui réagissent avec l'acétylimidazole. Cette sélection chimique ouvre une voie originale d'étude comme nous le verrons plus loin.

### 3°) Rôle possible des tyrosines accessibles au site actif de l'enzyme.

Réexaminons l'ensemble des résultats que l'on possède sur l'état des tyrosines dans la N  $\epsilon$  acétyltrypsine. Par des mesures de perturbation de solvant on peut distinguer quatre tyrosines sur dix : trois d'entre elles sont très accessibles et la quatrième un peu moins. Par acétylation des résidus hydroxyles des groupes phénoliques on peut mettre en évidence quatre tyrosines. Par méthylation il est possible de distinguer deux groupes. Le premier comprendrait deux tyrosines rapidement méthylables donc plus accessibles, ou mieux possédant un pK plus bas que les autres résidus. Ces acides aminés n'auraient aucun rôle dans l'augmentation des constantes de vitesse et ne seraient pas responsables de la variation d'activité se traduisant par un pK de 10. On peut donc penser qu'ils n'ont pas d'importance fondamentale au site actif de l'enzyme. Le second groupe comprend une tyrosine qui réagit beaucoup plus lentement avec le



sulfate de méthyle. Après méthylation de deux et trois tyrosines on peut acétyler 2 et 1 résidus ; on remarque alors que le phénomène d'accroissement des constantes cinétiques est dû à la substitution de l'un ou des deux résidus non méthylés.

Le problème est maintenant le suivant :

- a) peut-on distinguer ces deux résidus l'un par rapport à l'autre ?
- b) quel est leur rôle ?

Il est difficile de répondre à la première question. Si ces deux tyrosines étaient exactement identiques, elles devraient être méthylées simultanément et les mesures de perturbation de solvant nous les montreraient également accessibles ou inaccessibles, ce qui n'est pas le cas. En revanche, si l'on admet qu'elles diffèrent, on devrait pouvoir aisément le voir au niveau de l'activité enzymatique. Or il est net que, quantitativement, ces deux tyrosines ont une influence sur l'accroissement des constantes de vitesse. On peut estimer, sans en avoir la preuve absolue, que la troisième tyrosine méthylable a un rôle plus important que la quatrième que l'on ne peut pas substituer ainsi. N'ayant pas pu obtenir jusqu'à maintenant de renseignements plus précis sur ce sujet, nous préférons provisoirement conclure que la substitution par acétylation de deux hydroxyles phénoliques de tyrosines a un rôle dans l'augmentation des constantes de vitesse d'hydrolyse de substrats spécifiques esters et amides.

Quel peut être le rôle de ces deux tyrosines ? Puisque seules les constantes de vitesse sont modifiées on ne peut pas penser à une influence des groupes OH sur la fixation du substrat. Les très faibles variations de  $K_m$  et de  $K_s$  décelées pour les différentes formes d'enzyme excluent cette hypothèse. Nous pensons plutôt à une action indirecte de ces groupes sur la réaction chimique catalysée par l'enzyme. Cette influence se traduirait par une modification dans les propriétés du microenvironnement au site actif. L'acétylation et, à un degré moindre, la méthylation des acides aminés tyrosine provoquent des changements de polarité artificiels à proximité de l'histidine ou de la sérine ou des deux acides aminés à la fois composant le site actif.

Comment expliquer l'effet important provoqué par le groupe acétylé ? Si l'on admet que l'un des doublets n de l'oxygène phénolique peut provoquer



un effet électromère positif supérieur en valeur absolue à tout effet inducteur, on peut estimer que le changement de polarité apporté par le groupe acétyle est beaucoup plus important que celui provoqué par le OH. La perturbation dans la polarité du milieu est à peu près identique pour le -OH et le  $\text{OCH}_3$ , ce qui explique pourquoi on ne note qu'un faible accroissement des constantes de vitesse avec la  $\text{N}(\text{O-méthyl})_3$  e acétyltrypsine. Par cette explication nous admettrons que les tyrosines n'ont pas de rôle direct dans la catalyse enzymatique mais qu'elles peuvent modifier les constantes de vitesse en jouant sur les caractéristiques physico-chimiques du milieu dans lequel se trouvent les acides aminés importants pour la réaction d'hydrolyse des substrats. Si cela est exact ces deux résidus tyrosines par leur hydroxyle ont un rôle comparable à celui des deux lysines que l'on décèle en interaction avec l'histidine dans la région active de l'enzyme, en participant à la composition de l'environnement électrostatique des acides aminés du site actif de l'enzyme.

Cette conclusion nous paraît, à la lumière des résultats actuels, la plus logique. Elle tient compte des résultats obtenus par différents auteurs à l'aide de techniques spectrophotométriques.



## *C O N C L U S I O N*



## CONCLUSION

La recherche de la nature du groupe responsable de la variation des paramètres cinétiques aux pH alcalins dans la trypsine nous a conduit à étudier l'influence de modifications chimiques sur les groupes  $\epsilon$  aminés des résidus lysines, sur l' $\alpha$   $\text{NH}_2$  de l'isoleucine N terminale et sur les hydroxyles des tyrosines.

Nous avons pu montrer que le résidu  $\alpha$   $\text{NH}_2$  de l'isoleucine N terminale était certainement le groupe responsable du pK de 10 déterminé cinétiquement après avoir éliminé d'une part les  $\epsilon$   $\text{NH}_2$  des lysines par acétylation par l'anhydride acétique, d'autre part les résidus phénoliques des tyrosines accessibles par méthylation. Incontestablement, il faudrait être de mauvaise foi pour le nier, la méthode de modifications chimiques spécifiques des acides aminés, que nous avons choisie comme principe pour notre étude, donne des résultats plus définitifs que les études cinétiques qui n'apportent finalement que des hypothèses et non des réponses sur la nature des groupes impliqués dans la catalyse enzymatique. Si les réactions d'acétylation par l'anhydride acétique et l'acétylimidazole sont parfaitement décrites, en revanche la réaction de méthylation des tyrosines utilisée pour empêcher leur ionisation aux pH alcalins est, à notre connaissance, une méthode encore peu employée.

Les études cinétiques effectuées avec les différentes formes de trypsine, native ou chimiquement modifiée, sur divers substrats spécifiques et non spécifiques esters et amides nous ont permis de préciser certains points.

L'étude en fonction de la force ionique fait apparaître deux lysines en interaction avec l'imidazole réactif et situées à environ 7 ou 9 Å de celui-ci. Leur présence, favorisant la déprotonation de l'histidine, a pour effet de promouvoir la catalyse. D'autre part, dans l'enzyme libre, le carboxyl de fixation du substrat semble en interaction avec l'imidazole. Parmi les tyrosines présentes dans la trypsine, quatre sont accessibles au solvant quoique de façon différente comme le montre l'étude par perturbation de solvant, et la réaction de méthylation de ces groupes. L'acétylation de deux groupes phénoliques entraîne



une augmentation de la réactivité de l'enzyme. Ce travail souligne le rôle du microenvironnement au site actif.

Enfin l'ensemble de ces résultats cinétiques en fonction du pH n'est interprétable que si l'on admet l'existence d'un complexe de transconformation précédant l'étape d'acylation.

Est-il possible d'effectuer d'autres expériences pour confirmer que l' $\alpha$   $\text{NH}_2$  a un rôle dans l'activité de l'enzyme aux pH alcalins ? Le principal problème auquel nous nous sommes heurtés vient de ce que la trypsine acétylée sur les lysines est insoluble aux pH inférieurs à 6 à fortes concentrations du fait du changement important de la charge globale de la protéine. Il est cependant nécessaire pour étudier chimiquement ce résidu d'avoir bloqué auparavant les groupes aminés des lysines. Nous avons donc pensé à la guanidination de la protéine native sur les lysines (Kimmel, 1967), transformation qui n'affecte pas la charge globale de l'enzyme. Des expériences préliminaires montrent que cela est possible dans le cas de la trypsine sans perte de l'activité spécifique. Ceci fait, il nous est possible de substituer l' $\alpha$  aminé par l'anhydride maléique (par exemple), ce groupe ainsi traité est facilement libéré à pH acide sans intervention de nucléophile puissant (Butler et coll., 1967). Cette expérience nous permettrait d'étudier plus précisément la relation entre la libération de ce groupe et une éventuelle réactivation de l'enzyme. Nous cherchons, pour l'instant, à purifier la trypsine guanidinée et à étudier son comportement en fonction du pH.

Peut-on trouver une autre voie d'approche que ce blocage de l'hydroxyle phénolique pour éliminer ce groupe d'un rôle au pK de 10 ? La méthylation est, pour ce problème, la voie la plus directe. Mais on peut aussi diminuer de façon importante le pK des tyrosines par nitration en ortho des groupes hydroxyles (Sokolovsky et coll., 1966). Si une tyrosine est responsable de la variation d'activité aux pH alcalins et si, étant nitrée, son pK diminue, on doit voir une modification des courbes d'évolution des paramètres cinétiques en fonction du pH. Ces études sont en cours au laboratoire. Si la nitration des tyrosines peut donner des renseignements sur ce problème, elle permet aussi de fixer de façon covalente des chromophores sur la protéine. C'est un moyen intéressant pour



préciser l'influence éventuelle des tyrosines au site actif de l'enzyme, question que nous avons essayé d'aborder dans ce travail. Nous pensons, pour l'instant, que deux tyrosines ont un rôle au site actif dans l'établissement d'un microenvironnement favorisant la catalyse. Nous avons vu cela en combinant méthylation et acétylation des hydroxyles phénoliques des tyrosines. Nous estimons, par ailleurs, que ces groupes accessibles (au nombre de 4) n'ont aucune influence pour la fixation des substrats spécifiques sur l'enzyme. Quant à savoir si les noyaux benzéniques peuvent le faire, nous pensons pouvoir répondre à cette question en nitrant ces noyaux.

Nous pensons donc que le site actif de la trypsine comprend en plus de l'histidine 46 et de la sérine 183, l' $\alpha$   $\text{NH}_2$  de l'isoleucine N terminale, deux lysines, deux tyrosines et deux groupes carboxyliques. Que la liste en soit close, nous ne le pensons point. Le site actif doit aussi comporter d'autres acides aminés disons conformationnels pour lui donner une armature tridimensionnelle favorable. D'autre part, à côté de ces acides "aminés-charpente", peuvent se placer des groupes ayant un rôle dans l'établissement d'une micro-atmosphère facilitant la réaction catalytique (telles les deux lysines et les deux tyrosines mises en évidence dans ce travail).

Nous connaissons parfaitement l'enchaînement des acides aminés qui forment la chaîne peptidique de la trypsine. Nous avons l'intention de déterminer quelles sont les tyrosines qui réagissent avec le sulfate de méthyle. Cette étude, jointe à celle qui est en cours sur la nitration de ces mêmes groupes, nous permettra de donner un visage aux tyrosines du site actif. C'est un pas de plus vers la connaissance de la composition du site actif de la trypsine.

Dans cette étude chimique et cinétique, nous avons supposé, pour expliquer nos résultats, qu'il pouvait exister un complexe intermédiaire de trans-conformation. Cette question, nous l'avons dit, doit être étudiée par des méthodes rapides. Il est bien évident que, pour cette étude, les modifications chimiques spécifiques permettront de savoir quels sont les groupes perturbés dans ces phénomènes. Nous n'avons pas encore relié l'ensemble de nos résultats à des études de dispersion rotatoire. Ces expériences sont en cours au laboratoire. Elles nous permettront, pensons-nous, de décrire la structure globale de la protéine et de préciser le rôle des tyrosines et des lysines sur le comportement d'ensemble de la protéine en solution.



Notre étude étant plutôt orientée vers la détermination de la nature des groupes intervenant au site actif de l'enzyme que vers leur rôle dans la catalyse, il ne faut pas s'attendre à ce que nous parlions ici plus en détail du mécanisme de la réaction enzymatique. Nous n'avons pas voulu, non plus, présenter une illustration plus ou moins fantaisiste du site actif. Nous estimons que, pour représenter l'agencement tridimensionnel des neuf acides aminés qui le forment, l'imagination d'un chimico-cinéticien n'est pas suffisamment armée. Laissons aux cristallographes le dangereux privilège de réaliser ce travail.



*B I B L I O G R A P H I E*



## B I B L I O G R A P H I E

- R.A. ALBERTY et V. BLOOMFIELD; J. Biol. Chem.; 8 (1963) 2804.
- A. d'ALBIS et J.J. BECHET ; Biochim. Biophys. Acta ; 140 (1967) 435.
- A.K. BALLS et E.F. JANSEN; Advances in Enzymol.; 13 (1952) 321.
- T.E. BARMAN et H. GUTFREUND ; Biochem. J. ; 101 (1966) 411.
- J.J. BECHET; Thèse Orsay (1963).
- J.J. BECHET et J. YON; Biochim. Biophys. Acta ; 89 (1964) 117.
- J.J. BECHET ; J. Chim. Phys. ; 61 (1964) 584.
- J.J. BECHET ; J. Chim. Phys. ; 62 (1965) 1095.
- J.J. BECHET, M.C. GARDIENNET et J. YON; Biochim. Biophys. Acta ; 122 (1966) 101.
- J.J. BECHET; Thèse d'Etat Orsay (1968).
- J.J. BECHET et A. d'ALBIS; Biochim. Biophys. Acta ; 1969 (sous presse).
- M.L. BENDER et B.W. TURNQUEST JAm. Chem. Soc.; 79 (1957) 1656.
- M.L. BENDER et M.C. NEVEU ; J. Am. Chem. Soc.; 80 (1958) 5388.
- M.L. BENDER, G.R. SCHONBAUM et B. ZERNER ; J. Am. Chem. Soc.; 84 (1962 a) 2540.
- M.L. BENDER, G.R. SCHONBAUM et B. ZERNER ; J. Am. Chem. Soc.; 84 (1962 b) 2562.
- M.L. BENDER, G.E. CLEMENT, F.J. KEZDY et B. ZERNER; J. Am. Chem. Soc. 85 (1962) 358.
- M.L. BENDER, J.V. KILLHEFFER Jr. et F.J. KEZDY; J. Am. Chem. Soc. 86 (1964) 5330.
- M.L. BENDER et F.J. KEZDY; Annual Rev. of Biochem. (1965) 49.
- M.L. BENDER, M.L. BEGUE-CADOTON, R.L. BLANKELEY, L.J. BRUBACHER, J. FEDER, C.R. GUNTER, F.J. KEZDY, J.V. KILLHEFFER Jr., T.M. MARSHALL, C.G. MILLER, R.W. ROESKE et J.K. STOOPS; J. Am. Chem. Soc. 88 (1966) 5890.
- P. BENMOUYAL et C.G. TROWBRIDGE, Arch. Biochem. Biophys. ; 115 (1966) 67.
- I.V. BEREZIN, G. Ya. KOLOMIJTSJEVA, A.V. LEVASKOV et K. MARTINEK; Dokl. Akad. Nauk SSSR ; 171 (1966) 1213.
- S.A. BERNHARD, S.J. LAU et H. NOLLER,; Biochem. 4 (1965) 1108.
- S. BERNHARD; Structure Chemistry and Molecular Biology - Ed. Al. Rich et N. Davidson; 1968, 98.
- J.L. BETHUNE, D.D. ULMER et B.L. VALLEE; Biochem. 3 (1964) 1764.



T.C. BRUCE et S. BENKOVIC; Biorganic mechanisms W.A.BENJAMIN ; Inc. New York  
 Amsterdam (1966) n° 1 82.

P.J. G. BUTLER, J.I. HARRIS, B.S. HARTLEY et R. LEBERMANN; Biochem. J. (1967)  
 103 78.

M. CASTENADA AGULLO et L.J. DEL CASTILLO; Gen. Physiol. 42 (1959) 817.

E. CHARNEY et S.A. BERHNARD; J. Am. Chem. Soc. 89 (1967) 2726.

J. CHEVALLIER et J. YON; Biochim. Biophys. Acta 122 (1966) 116.

J. CHEVALLIER, J. YON, G. SPORTONO et J. LABOUESSE; European J. Biochem. 5 (1968)  
 480.

D.J. CRAM et G.S. HAMMOND dans Organic Chemistry 2ème Edition , Mc Grawhill  
 Koyakusha N.Y. Tokyo , (1964) 251.

J. DAYAN et I.B. WILSON; Biochim. Biophys. Acta 81 (1964) 620.

M. DELAAGE et M. LAZDUNSKI, Biochim. Biophys. Acta;105 (1965)523.

M. DELAAGE et M. LAZDUNSKI; Biochem. Biophys. Acta ; 140 (1967) 417.

M. DELAAGE et M. LAZDUNSKI; Biochem. Biophys. Research. Commun. ; 28 (1967) 390.

S.G. DEREK; J. Biol. Chem. ; 242 (1967) 1592.

P. DESNUELLE et M. ROVERY; Conférences et Rapports, 3ème Congrès Inter. Biochimie  
 Bruxelles (1955) 78.

M. DIXON; Biochem. J.; 55 (1953) 161.

G.H. DIXON, D.L. KAUFFMAN et H. NEURATH; J. Biol. Chem. 233 (1958 a ) 1373.

G.H. DIXON, D.L. KAUFFMAN et H. NEURATH; J. Am. Chem. Soc. 80 (1958 b ) 1260.

A. DUPAIX, Thèse Orsay 1969.

E.J. EAST et C.G. TROWBRIDGE ; Arch. Biochim. Biophys. 125 (1968) 334.

J.T. EDSALL et J. WYMAN,; Biophysical Chemistry Acad. Press Inc. New York (1958).

B.F. ERLANGER, H. CASTLEMAN et A.G. COOPER, J. Am. Chem. Soc. 85 (1963) 1872.

C. GHELIS, J. LABOUESSE et B. LABOUESSE; Biochem. Biophys. Res. Commun. 29 (1967) 101.

N.M. GREEN et H. NEURATH; J. Biol. Chem. 204 (1953) 379.

H. GUTFREUND; Trans. Farad. Soc. 51 (1955) 441.

Y.HACHIMORI, A. MATSUSHIMA, M. SUZUKI, Y. INADA et K. SHIBATA; Biochim. Biophys.  
 Acta; 124 (1966) 395.

R.P. HAUGLAND et L. STRYER; Conformation of Biopolymers,Ramachandran Ac. Press  
 Vol. 1 (1967) 321.



T.T. HERSKOVITS et M. LASKOWSKI Jr.; J. Biol. Chem. 235 (1960) P C 57.

T.T. HERSKOVITS et M. SORENSEN ; Biochemistry 7 (1968 a ) 2523.

T.T. HERSKOVITS et M. SORENSEN ; Biochemistry 7 (1968 b ) 2533.

L.L. HOUSTON et K.A. WALSH ; Biochem. Biophys. Res. Commun. 25 (1966) 175.

Y. INADA; J. of Biochem. 49 (1961) 217.

Y. INADA, M. KAMATA, A. MATSUSHIMA et K. SHIBATA; Biochim. Biophys. Acta 81 (1964) 323.

T. INAGAMI et J.M. STURTEVANT; J. Biol. Chem. 235 (1960) 1019.

W.P. JENCKS ;J. Am. Chem. Soc. 80 (1958) 4581.

W.P. JENCKS et J. CARRIUOLO; J. Biol. Chem. 234 (1959) 1272 et 1280.

W.P. JENCKS et M. GILCHRIST; J. Am. Chem. Soc. 86 (1964) 5616.

G. JOHANNIN et J. YON; Biochem. Biophys. Research Commun. 25 (1966) 320.

D. KARIBIAN, C. LAURENT, J. LABOUESSE et B. LABOUESSE; European J. Biochem. 5 (1968) 260.

S. KAUFMAN, H. NEURATH et G.W. SCHWERT; J. Biol. Chem. 234 (1959) 294.

J.R. KIMMEL dans Methods in Enzymology IX 1967 584.

D.E. KOHSHLAND Jr. Adv. in Enzymology 22 (1960) 45.

R.M. KRUPKA et K.J. LAIDLER; Trans. Faraday Soc. 56 (1960) 1467.

J. LABOUESSE et M. GERVAIS; European J. Biochem. 2 (1967) 215.

M. LASKOWSKI Jr. ; Fed. Proceed. 25 (1966) 20.

S.J. LEACH et H.A. SCHERAGA; J. Am. Chem. Soc. 82 (1960) 4790.

M. MARES-GUIA et E.N. SHAW; J. Biol. Chem. 240 (1965) 1579.

M. MARES-GUIA et E.N. SHAW ; J. Biol. Chem. 242 (1967) 5782.

M.A. MARINI et G.P. HESS; J. Am. Chem. Soc. 82 (1960) 5160.

S. MAROUX, M. ROVERY et P. DESNUELLE; Biochem. Biophys. Acta 122(1966) 147.

O. MIKES, V. TOMASEK, V. HOLEYSOVSKY et F. SORM ; Coll. Czechoslov. Chem. Commun. 32 (1967) 655.

M. MONNOT et J. YON; Biochim. Biophys. Acta 92 (1964) 105.

M. MONNOT Thèse Orsay (1969).

A.Y. MOON, J. MERCOUROFF et G.P. HESS ; J. Biol. Chem. 240 (1965) 717.

S. MOORE et W.M. STEIN ; J. Biol. Chem. 176 (1948) 367.



H. NEURATH ; Conférences et Rapports , 3ème Congrès Inter. Biochimie , Bruxelles 1955 89.

H.S. OLCOTT et H.L. FRAENKEL-CONRATH , Chem. Revs. 41 (1947) 151.

H.S. OPPENHEIMER et G.P. HESS, Nature 198 (1963) 689.

H.L. OPPENHEIMER, B. LABOUESSE et G.P. HESS; J. Biol. Chem. 241 (1966) 2720.

P.H. PETRA, W. COHEN et E.N. SHAW; Biochem. Biophys. Research Commun. 21 (1965) 612.

W.P. RAY Jr., J.J. RUSCISA et D.E. KOSHLAND Jr., J. Am. Chem. Soc. 82 (1960) 4739.

J.F. RIORDAN et B.L. VALLEE; Biochem. 2 (1963) 1460.

J.F. RIORDAN, W.E.C. WARREN, E.C. WACKER, B.L. VALLEE; Biochem 4 (1965) 1758.

S.T. SCRIMGER et T. HOFMAN ; J. Biol. Chem. 242 (1967) 2528.

F. SEYDOUX Thèse Orsay 1966.

E.N. SHAW M. MARES-GUIA et W. COHEN , Biochem. 4 (1965) 2219.

P.B. SIGLER, D.M. BLOW, B.W. MATTHEWS et R. HENDERSON , J. Mol. Biol. 35 (1968) 143.

R.T. SIMPSON, J.F. RIORDAN et B.L. VALLEE, Biochem 2 (1963) 616

S.J. SINGER ; Adv. in Protein chemistry 22 (1967) 1.

M. SOKOLOVSKY, J.F. RIORDAN, et B.L. VALLEE; Biochem 5 (1966) 3582.

J.A. STEWARD et L. QUELLET, Canad. J. of Chem. 37 (1959) 751.

C. TANFORD; Adv. in protein Chem. 17 (1961) 70.

C. TANFORD; J. Am. Chem. Soc. 83 (1961) 1628.

C.G. THROWBRIDGE, A. KREHBIEL et M. LASKOWSKI Jr. ; Biochem 2 (1963) 843.

V. TOMASEK, E.S. SEVERIN et F. SORM; Biochem. Biophys. Research. Commun. 20 (1965) 545.

L.H. TRENHOLM, W.E. SPOMER et J.F. WOOTTON; J. Am. Chem. Soc. 88 (1966) 428.

L.H. TRENHOLM, W.E. SPOMER et J.F. WOOTTON ; 154th meeting Am. Chem. Soc. (1967) abstracts C. 30.

K.A. WALSH et H. NEURATH ; Proc. Natl. Acad. Sci.U.S. 52 (1954) 884.

K. WALSH, D.L. KAUFFMAN, K.S.V. SAMPATH KUMAR et H. NEURATH; Proc. Natl. Acad. Sc. U.S. 51 (1964) 301.

S.S. WANG et F.H. CARPENTER; J. Biol. Chem. 242 (1968) 3702.

J.L. WEBB dans "Enzymes and metabolic Inhibitors" Vol. 1 (1963) 232.



D.B. WETLAUFER, J.T. EDSALL et B.R. HOLLINGWORTH ; J. Biol. Chem., 233 (1958) 1421.

D.B. WETLAUFER ; Advances in protein chemistry, 17 (1962) 303.

J. YON ; "Dynamique conformationnelle des protéines en solution" Hermann Ed. Paris (1969).

B. ZERNER et M.L. BENDER ; J. Am. Chem. Soc. 86 (1964) 3669.

B. ZERNER, R.P.M. BOND et M.L. BENDER ; J. Am. Chem. Soc. 86 (1964) 3674.



*Ce travail a été effectué dans le laboratoire d'Enzymologie Physico-chimique et moléculaire de la Faculté des Sciences d'ORSAY.*

*Je tiens à exprimer la plus vive reconnaissance à Mademoiselle YON, Directeur de Recherches au C.N.R.S. , pour les précieux conseils, les encouragements renouvelés et les ardentes discussions que nous avons eues.*

*Je remercie Monsieur le Professeur TONNELAT et Monsieur le Professeur PUDLES pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et pour avoir bien voulu faire partie du jury de ma thèse.*

*Je tiens à remercier tout particulièrement Madame LABOUESSE qui a guidé mes premiers pas sur les sentiers glissants de la chimie des protéines.*

*Les erreurs contenues dans ce travail ne sont pas dues à l'aimable secrétariat qui en a assuré la réalisation technique.*





